



HAL
open science

Caractérisation structurale et fonctionnelle de PBP1b de *Streptococcus pneumoniae* et son implication dans la découverte de nouveaux inhibiteurs

Pauline Macheboeuf

► **To cite this version:**

Pauline Macheboeuf. Caractérisation structurale et fonctionnelle de PBP1b de *Streptococcus pneumoniae* et son implication dans la découverte de nouveaux inhibiteurs. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00115254

HAL Id: tel-00115254

<https://theses.hal.science/tel-00115254>

Submitted on 20 Nov 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Spécialité : Biologie Structurale et Nanobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Pauline MACHEBOEUF

Le 6 Novembre 2006

**Caractérisation structurale et fonctionnelle de PBP1b de
Streptococcus pneumoniae et son implication dans la
découverte de nouveaux inhibiteurs**

Présidente du jury

Eva PEBAY-PEYROULA

Rapporteurs

Paulette CHARLIER

Jean VAN HEIJENOORT

Examineur

Marc JAMIN

Directeurs de thèse

Andréa DESSEN

Otto DIDEBERG

Thèse préparée au Laboratoire des Protéines Membranaires (LPM) de l'Institut de Biologie
Structurale Jean-Pierre EBEL (IBS) CEA/CNRS/UJF

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Otto Dideberg directeur du LCM, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir fait partager sa passion des PBP et des structures.

Un immense merci à Andréa Dessen qui a été mon «chef» pendant ces 4 années ! Ce fut un grand bonheur tant scientifique qu'humain de travailler à tes côtés. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris en biochimie et en cristallographie, pour m'avoir donné confiance en moi et pour m'avoir constamment soutenue pendant les périodes de découragement.

Je tiens à remercier Mesdames Paulette Charlier de l'Université de Liège, Eva Pebay-Peyroula de l'IBS et Messieurs Jean van Heijenoort de l'Université de Paris-sud, Marc Jamin de l'IVMS à Grenoble pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie particulièrement Viviana Job qui m'a initiée à la biologie moléculaire et à la biochimie. Vivi, je ne te remercierais jamais assez pour ta disponibilité, ta gentillesse, pour nos discussions et pour tes tiramisus !!

Merci à Thierry Vernet, André Zapun et particulièrement à Anne-Marie Di Guilmi du LIM pour les nombreuses discussions sur les PBP de classe A. Merci Anne-Marie pour avoir débroussaillé le terrain miné des classes A ; en verra t'on jamais le bout ... de la structure ?

Merci à Richard Kahn pour sa disponibilité à tout instant pour le traitement des données, pour passer une nuit au synchrotron, pour discuter tout simplement...

Un grand merci à David Lemaire sans qui on n'aurait pas pu croire à cet intermédiaire réactionnel... David, merci surtout pour ton amitié.

Je tiens à remercier Stéphanie Finet de l'ESRF pour nous avoir permis de collecter des données SAXS sur la ligne ID2 et pour m'avoir initiée à la technique.

Je remercie particulièrement Patrice Vachette sans qui le projet SAXS n'aurait pas pu aller si loin. Ses conseils et sa disponibilité m'ont permis de ne pas abandonner ce projet difficile mais tellement enrichissant.

Je remercie le docteur Jacques Croizé du CHU de Grenoble pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir fournis des souches de pneumocoques résistants.

J'exprime toute mon amitié aux thésards, post-docs, chercheurs, ingénieurs, techniciens présents et passés du LIM : Laurent, Cécile, Audrey, Benoît, Marjo, Julien ; du LPM : Sylvie, Hugues, Lionel, Cécile, Meike, Carlos, Manu, Andréas, Mélissa Clotilde, Michel ; du LCCP : Philippe, Yvain, Anne, Madalen, qui, grâce à leur bonne humeur et à leur amitié m'ont permis de passer 4 années inoubliables.

Je remercie mes parents pour m'avoir appris la persévérance, la ténacité et pour m'avoir encouragée à explorer mes propres voies.

Antoine, pour ton amour et ton soutien et pour tout ce que tu as fait pour moi, un simple merci ne serait pas suffisant...

Table des matières

Abréviations	1
Introduction	5
I. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
I.1. Présentation	7
I.2. Processus d'infection	7
I.3. Les infections associées	8
I.4. Les vaccins disponibles	9
I.5. la résistance aux antibiotiques	10
I.5.1. L'apparition des souches résistantes	10
I.5.2. Les mécanismes moléculaire de la résistance aux β -lactamines	11
I.6. Les approches pour combattre la résistance	12
II. Le peptidoglycane	15
II.1. Localisation et fonctions du peptidoglycane	15
II.2. Composition chimique	16
II.3. Voie de synthèse du peptidoglycane	16
II.3.1. Les étapes cytoplasmiques	16
II.3.2. Les étapes périplasmiques	18
II.3.3. Nature du pentapeptide	20
II.4. Ultrastructure du peptidoglycane, les différents modèles en jeu	22
III. Les Penicillin-Binding Proteins (PBPs)	23
III.1. Classification génomique et structurale	23
III.1.1. Les PBP de classe A	24
III.1.1.1. Topologie	25
III.1.1.2. L'association des PBP de classe A avec la membrane rend leur étude structurale difficile	27
III.1.2. Les PBP de classe B	28
III.1.3. Les PBP de faible poids moléculaire	30
III.2. Mécanismes réactionnels	30
III.2.1. Mécanisme catalytique des glycosyltransférases	31
III.2.1.1. Caractérisation de l'activité glycosyltransférase	31
III.2.1.2. Mécanisme de la réaction de transglycosylation	32
III.2.1.3. Inhibition de la réaction de transglycosylation	35
III.2.2. Mécanisme réactionnel des transpeptidases	37
III.2.2.1. Caractérisation de l'activité transpeptidase	37
III.2.2.2. Mécanisme de la réaction de transpeptidation	39
III.2.2.3. Inhibition de l'activité transpeptidase	40
III.3. Résistance aux antibiotiques	41
III.3.1. Production de β -lactamases	41
III.3.2. Les pompes à efflux	45
III.3.3. Modification de la cible des β -lactamines : les PBP	46
III.3.3.1. Les PBP modifiées du pneumocoque	46
III.3.3.2. Résistance à la méthicilline chez <i>S. aureus</i>	49
III.3.3.3. Résistance chez <i>Enterococcus faecium</i>	50
III.4. Implication des PBP <i>in vivo</i>	52

III.5. Rôle des PBP dans les étapes de division cellulaire	54
Contexte et objectif des travaux	57
Matériel et méthodes	61
I. Clonage, expression et purification de PBP1b-WT	63
I.1. Clonage de FL-PBP1b-WT	63
I.2. Purification de FL-PBP1b-WT et de son domaine transpeptidase	64
I.3. Séquençage N-terminal	65
II. Clonage, expression et purification de PBP1b*	67
II.1. Mutagenèse dirigée de PBP1b : FL-PBP1b*	67
II.2. Purification de FL-PBP1b* et de son domaine transpeptidase	67
II.3. Production de protéine sélénée	68
III. Clonage, expression et purification des différentes constructions de GT	69
III.1. Clonage des différentes constructions de GT	69
III.2. Tests de purification des constructions GT	71
III.3. Purification du domaine glycosyltransférase GT_[74-321]	72
III.4. Utilisation des anticorps monoclonaux pour stabiliser les domaines GT	73
III.4.1. Production et purification des Fab	73
III.4.2. Complexes GT-Fab	74
IV. Méthodes de caractérisation des protéines	75
IV.1. Spectrométrie de masse	75
IV.1.1. Principes	75
IV.1.2. Contrôle qualité par spectrométrie de masse ESI dénaturante	75
IV.1.3. Détermination de la masse du peptide GT par spectrométrie de masse en conditions natives	76
IV.1.4. Complexe protéine-inhibiteurs, protéine-substrat	76
IV.1.5. Mesures de la stabilité des complexes protéines-inhibiteurs par spectrométrie de masse	77
IV.2. La diffusion dynamique de lumière	78
IV.3. Le dichroïsme circulaire	78
IV.3.1. Principes	78
IV.3.2. Comparaison des protéines FL-PBP1b* et FL-PBP1b-WT par dichroïsme circulaire	79
IV.4. Etudes fonctionnelles de PBP1b	80
IV.4.1. Caractérisation de l'efficacité d'acylation	80
IV.4.2. Caractérisation de la transpeptidation	81
V. Techniques de bactériologie	83
VI. Etudes structurales de PBP1b*	85
VI.1. Introduction à la cristallographie des rayons X	85
VI.1.1. Cristallogénèse	85
VI.1.2. Le principe de diffraction des rayons X par un cristal de protéine	86
VI.1.3. Détermination des intensités de diffraction	88
VI.1.4. Résolution du problème de la phase	88

VI.1.4.1. La loi de Friedel	89
VI.1.4.2. La diffusion anormale	90
VI.1.4.3. Le remplacement moléculaire	92
VI.1.5. Affinement des structures	93
VI.2. Cristallogenèse et cristallographie de PBP1b*	95
VI.2.1. Cristallogenèse du domaine PBP1b*	95
VI.2.2. Enregistrements des données de diffraction	96
VI.2.3. Structure de PBP1b*	96
VI.3. Structures de PBP1b* en complexes avec des inhibiteurs et un pseudo-substrat	97
VI.3.1. Complexes entre PBP1b* et des inhibiteurs et un substrat	97
VI.3.2. Collectes des données de diffraction	97
VI.3.3. Résolution des structures de complexes	98
VII. Etudes structurales de PBP1b par diffusion de rayons X aux petits angles	99
VII.1. Introduction au SAXS	99
VII.2. Détermination des paramètres structuraux	100
VII.3. Collectes et traitements des données	102
VII.3.1. Montage expérimental et enregistrement des données	102
VII.3.2. Détermination expérimentale des paramètres structuraux	104
VII.3.3. Modélisation <i>ab initio</i>	104
VII.3.4. Modélisation par reconstruction à partir d'un modèle existant	105
Résultats et discussion	109
I. Détermination de la structure du domaine transpeptidase de PBP1b et mécanisme d'activation	111
I.1. Structure de PBP1b* sous sa forme native	111
I.1.1. Purification de PBP1b*	111
I.1.2. Cristallogenèse de PBP1b*	114
I.1.3. Résolution de la structure de PBP1b*	115
I.1.4. Structure globale de PBP1b*	117
I.1.5. Le site actif de PBP1b* est inaccessible aux ligands	122
I.1.6. Caractérisation fonctionnelle de PBP1b*	124
I.2. Structure de PBP1b* en complexe avec un pseudo-substrat de la réaction	127
I.2.1. Structure de l'intermédiaire réactionnel entre PBP1b* et S2d	127
I.2.2. Caractérisation fonctionnelle de l'étape d'acylation par le S2d	131
I.2.3. Caractérisation fonctionnelle de l'étape de désacylation	133
I.2.4. Caractérisation de la transpeptidation sur PBP1b*	136
I.2.5. Comment avons-nous pu piéger l'intermédiaire réactionnel ?	137
I.2.6. Discussion sur la dynamique de PBP1b*	139
I.2.7. Dynamique de PBP1b* dans la cellule	141
II. Complexes de PBP1b* avec des inhibiteurs, implication dans la synthèse de nouvelles molécules	143
II.1. Complexes de PBP1b* avec la nitrocéfine et la céfotaxime	143
II.2. Complexes de PBP1b* avec des composés β -lactames mimant le peptidoglycane	147
II.3. Des nouvelles molécules de type γ -lactame, un espoir pour la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs	153

II.3.1. Caractérisation structurale des complexes PBP1b*-lactivicine et PBP 1b*-TB-3-48	155
II.3.2. Caractérisation fonctionnelle	158
II.3.3. Caractérisation bactériologique	159
II.4. Ce que nous ont appris tous ces complexes	161
III. Etudes biochimiques et structurales du domaine glycosyltransférase de PBP1b	169
III.1. Etudes biochimiques des différentes constructions de GT	169
III.1.1. Clonage des différentes constructions de GT	169
III.1.2. Essais de purification des différentes constructions	170
III.1.3. Purification du domaine GT_[74-321]	172
III.1.4. Utilisation des anticorps pour stabiliser les différents domaines de PBP1b	173
III.1.5. Essais de cristallogenèse	177
III.2. Etudes structurales de la forme périplasmique de PBP1b en solution par SAXS	178
III.2.1. Extraction des paramètres structuraux	178
III.2.2. Modélisation <i>ab initio</i>	181
III.2.3. Modélisation à partir du modèle de PBP1b* par le programme CREDO	185
III.2.4. Modélisation à partir du modèle de PBP1b* par le programme BUNCH	187
 Conclusions et perspectives	 191
 Références	 199
 Annexes	 221
Annexe A	223
Annexe B	224
Publication 1	225
Publication 2	233

Abréviations

Abbréviations

A	Absorbance
Å	Angström
ADN	Acide désoxyribonucléique
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CP	Carboxypeptidase
<i>Dcw</i>	« Division and Cell Wall cluster »
DLS	Diffusion dynamique de lumière
DO	Densité optique
DTT	1,4-dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
Fab	« Fragment antigen binding »
Fc	« Fragment cristallisable »
FL-PBP1b*	Forme périplasmique de PBP1b contenant les résidus 74-791 et les mutations R336Q et RR686/7QQ.
FL-PBP1b-WT	Forme périplasmique de PBP1b contenant les résidus 74-791.
GlcNAc	N-acétyl-glucosamine
GT	Glycosyltransférase
GST	Gluthation S-transférase
HMW-A PBP	PBP de haut poids moléculaire, de classe A
HMW-B PBP	PBP de haut poids moléculaire, de classe B
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
k_3	Constante de désacylation
k_2/K	Efficacité d'acylation
LMW PBP	PBP de faible poids moléculaire
m/z	rapport masse sur charge
MAD	« Multiwavelength anomalous dispersion »
MGT	Mono Glycosyltransférase
MurNAc	acide N-acétyl-muramique
PBP1b*	Forme périplasmique de PBP1b contenant les résidus 101-125 et 305-791 et les mutations R336Q et RR686/7QQ.

PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PDB	« Protein Data Bank »
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
Qsp	Quantité suffisante pour
rpm	rotations par minutes
Rg	rayon de giration
S2d	acide N-benzoyl-D-alanylmercaptoacétique
SAXS	« Small Angle X-ray Scattering »
SDS-PAGE	gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes
TP	Transpeptidase
U.A.	Unité d'absorbance

Introduction

I. *Streptococcus pneumoniae*

I.1. Présentation

Streptococcus pneumoniae est une bactérie Gram positive de forme ovoïde, de 0,5 à 1,25 μm de diamètre, présentant à sa surface un anneau équatorial formé par une excroissance de matériel constituant la paroi bactérienne. Sa croissance s'effectue en cellules isolées, en diplocoques, ou bien encore en courtes chaînes (Figure 1). Elle a été isolée en 1881 simultanément aux Etats-Unis par George Miller Sternberg, et en France par Louis Pasteur (Tomasz, 1999).

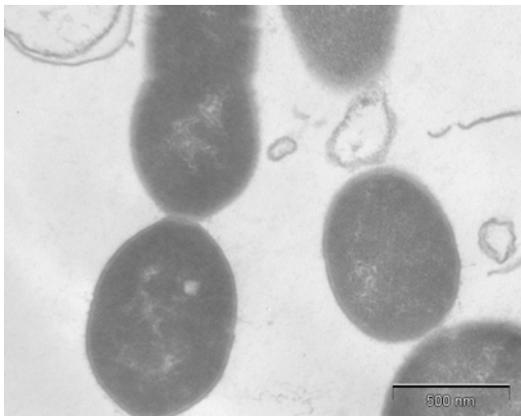


Figure 1 : Cliché de microscopie électronique de la souche *S. pneumoniae* non encapsulée R6 prise par Anne-Marie Di Guilmi (LIM, IBS).

Le pneumocoque peut être entouré d'une capsule polysaccharidique et dans ce cas, devenir pathogène. Cette capsule permet de moduler le passage de molécules vers l'enveloppe cellulaire, d'assurer l'adhérence de la bactérie sur des surfaces organiques ou non, et de former des biofilms et des microcolonies (Jones, 1998). Elle est donc considérée comme essentielle lors des processus d'invasion. En outre elle permet de déjouer la phagocytose, et est donc impliquée dans le phénomène de virulence de la bactérie. Aujourd'hui on recense 90 types de polysaccharides différant de par leurs compositions chimiques que l'on peut associer à différents types immunologiques ou sérotypes (Henrichsen, 1995).

I.2. Processus d'infection

S. pneumoniae est une bactérie commensale de la sphère oro-pharyngée, pour laquelle la colonisation est asymptomatique. Elle se niche généralement au niveau des voies respiratoires supérieures. Au sein des collectivités d'enfants, près de 50% des individus peuvent être colonisés par cette bactérie et le taux d'infection est généralement plus important

pendant la période hivernale. Le taux de colonisation baisse sensiblement avec l'âge pour atteindre 5-10% chez l'adulte (Levy, 1998).

Les mécanismes d'adhésion du pneumocoque varient en fonction de la cellule hôte, ils sont nombreux et encore mal compris. Un des mécanismes les mieux connus est celui de l'adhésion au nasopharynx. Dans une première phase, il a été montré l'importance de glycoconjugués situés en surface dans les phénomènes d'adhérence aux cellules du nasopharynx (Andersson *et al.*, 1983). Dans une seconde phase le pneumocoque utilise la phosphorylcholine en surface de sa paroi cellulaire pour se fixer aux récepteurs du PAF (Platelet-Activating Factor) qu'il dérégule, permettant ainsi son internalisation au sein de vacuoles formées par invagination de la membrane cellulaire. Ces vacuoles transitent à travers le cytoplasme pour s'extraire du côté de la face baso-latérale de la cellule et ainsi avoir accès à la matrice extracellulaire (Geelen *et al.*, 1993). Dans des conditions pathologiques, les phénomènes de colonisation par adhésion sur les matrices extracellulaires s'effectuent par reconnaissance directe de la laminine, du collagène IV ou du plasminogène par des facteurs de virulence ou des toxines situées en surface de la bactérie (Eberhard *et al.*, 1999).

La migration vers l'épithélium alvéolaire conduit rapidement à l'invasion du sang, provoquant ainsi une bactériémie puis la septicémie. Les actions des neuraminidases et hyalurodinases capables de dégrader le tissu conjonctif permettent le passage de la barrière hémato-encéphalique donnant lieu à des méningites (Eberhard *et al.*, 1999).

I.3. Les infections associées

Le pneumocoque est impliqué dans trois types d'infections : méningite, pneumonie et otite sévère, qui peuvent toucher les enfants et les adultes. Cependant, les infections se développent préférentiellement chez les personnes d'âges extrêmes (personnes âgées et nouveau-nés) ainsi que chez les personnes immunodéprimées (SIDA, thérapie du cancer...).

Environ 130000 pneumonies à pneumocoques surviennent chaque année en France, soit 30 à 50% des hospitalisations pour pneumonies. Le taux de létalité d'une pneumonie à pneumocoque avoisine 10 à 30% (Académie Nationale de Médecine, communication le 5 novembre 2002). Dans le monde, environ 4 millions d'enfants meurent d'une pneumonie chaque année, dont environ 1 million sont à attribuer à *S. pneumoniae*, principalement dans les pays en voie de développement.

S. pneumoniae est la première cause de méningite bactérienne, ainsi que de mortalité par infection bactérienne avant l'âge de 2 ans (d'après la Société Française de Pédiatrie et le

Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique). Le jeune âge est un déterminant majeur du risque d'infection pneumococcique : près de la moitié des bactériémies et les trois-quarts des méningites du jeune enfant surviennent au cours de la première année de vie. Les bactériémies à pneumocoques peuvent le plus souvent être guéries par antibiotiques, au contraire des méningites à pneumocoques qui peuvent provoquer de graves séquelles, voire le décès de l'enfant atteint. Elles représentent 70% des méningites chez l'enfant de moins de 2 ans et 23% des méningites chez l'enfant de plus de 8 ans.

Enfin, sans danger pour la vie de l'enfant, les otites moyennes bactériennes sont également fréquentes et représentent la première cause de surdité acquise chez l'enfant. Un tiers d'entre elles sont causées par le pneumocoque (Observatoire National des Méningites Bactériennes de l'Enfant, 2002).

I.4. Les vaccins disponibles

Les premiers vaccins testés au début du vingtième siècle, préparés à partir d'extraits bruts de pneumocoque, ne présentaient que rarement un effet protecteur, et malheureusement une forte réactivité entraînant le déclenchement d'infections. Ces mêmes vaccins furent ensuite utilisés chez les animaux pour développer des anticorps spécifiques (Heffron, 1939). Dans les années 1930, il a été montré que les anticorps spécifiques étaient dirigés contre les polysaccharides de la capsule du pneumocoque, permettant le développement de nouveaux types de vaccins (Robbins *et al.*, 1983). Les premiers essais effectués pendant la deuxième guerre mondiale sur des volontaires de l'armée américaine aboutissent en 1945 au premier vaccin américain dirigé contre quatre polysaccharides (MacLeod, 1945). Cependant les premiers essais de vaccination sont assez rapidement suspendus en raison de l'apparition des antibiotiques. Lorsque apparaissent les premières souches de pneumocoques résistantes aux antibiotiques dans les années 1960-1970, les molécules de la capsule redeviennent des cibles de la recherche de vaccins. Une vaste campagne de vaccination est entreprise avec succès en Afrique du Sud et en Nouvelle-Guinée à l'aide de vaccins polysaccharidiques multivalents. Elle aboutit en 1977 à la création d'un nouveau vaccin à 14 valences (Austrian, 1981; Robbins *et al.*, 1983). Dans la même optique, un vaccin à 23 sérotypes différents (Pneumovax 23®-Merck, Pneumo23®-Aventis Pasteur et Pnu-Immune®-Wyeth Ayerst) est mis au point en 1983 couvrant environ 90% des infections causées par *S. pneumoniae* aux Etats Unis (Robbins *et al.*, 1983). Malgré une efficacité certaine chez l'adulte, le vaccin 23-valent reste peu efficace chez l'enfant de moins de 2 ans et la personne âgée, pour lesquels il n'existe

qu'une faible reconnaissance des polysaccharides 6B, 9V, 19F et 23F du pneumocoque (Sankilampi *et al.*, 1997).

La faible réactivité des enfants de moins de 2 ans aux polysaccharides serait due à une immaturité des lymphocytes B qui ne peuvent être activés et moduler une réponse immunitaire. Une solution alternative est développée en associant de façon covalente des polysaccharides à une protéine porteuse, laquelle augmente l'efficacité de stimulation des lymphocytes T, matures dans les premières années de vie. De nombreux tests utilisant des polysaccharides du pneumocoque associés à des toxines diphtériques, tétaniques ou conjugués à des protéines de la membrane externe des méningocoques, ont démontré l'immunogénicité du vaccin conjugué chez les enfants en bas âge et ceci sans aucun risque dû à la présence de la toxine (Levine, 1997). Depuis février 2001, un nouveau vaccin conjugué (Pevnar®-Wyeth Lederle) est disponible sur le marché européen. Il contient 7 sérotypes (vaccin heptavalent) des 7 souches les plus couramment répandues et les plus résistantes, chaque polysaccharide étant couplé à une protéine diphtérique non toxique. Les études menées aux Etats-unis sur plus de 37000 enfants ont montré une efficacité protectrice de 93% pour les méningites et pneumonies et de 57% pour les otites moyennes aiguës (Abramson, 2000).

Ce type de vaccin n'est pas idéal malgré sa forte immunogénicité. En effet, ils ne protègent pas contre toutes les infections à pneumocoques. De plus on peut imaginer aisément l'apparition de nouvelles souches à polysaccharides totalement différents. Enfin, la fabrication des vaccins glycoconjugués est très coûteuse et peu remboursée. La mise en place de plan de vaccination systématique reste donc difficile à mettre en œuvre puisque le calendrier vaccinal recommande l'administration de 4 doses de vaccin entre 2 et 18 mois.

I.5. La résistance aux antibiotiques

I.5.1. L'apparition de souches résistantes

Le 3 septembre 1928, Alexander Fleming découvre qu'une substance sécrétée par le champignon *Penicillium notatum* inhibe la croissance de souches de staphylocoques ; il l'appelle aussitôt la pénicilline. Les premières étapes de purification sont réalisées vers la fin des années 1930 pour atteindre une production de 100 milligrammes en mars 1940 puis 200 fois plus grâce à la découverte d'une nouvelle souche plus productrice : *Penicillium chrysogenum*.

L'introduction de la pénicilline en 1941 pour usage médical dans le contexte de la seconde guerre mondiale a eu un large impact sur le traitement de maladies infectieuses jusqu'alors mortelles. Les années suivantes ont été considérées comme les années fastes de l'antibiothérapie (1950-1970) avec l'espoir de voir la fin du règne des maladies infectieuses.

Les premiers signes de résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque apparaissent en 1965 à Boston, puis une souche résistante à la pénicilline est décrite en 1967 en Australie et enfin une souche multirésistante est découverte en 1977 en Afrique du Sud (Jacobs *et al.*, 1978). La résistance à la pénicilline se propage alors rapidement à travers le monde dans les années 1980, particulièrement en Afrique du Sud, en Espagne, en Hongrie et en France, pour laquelle la diminution de la sensibilité à la pénicilline G apparaît en 1978 (Casal, 1982; Geslin *et al.*, 1992; Marton *et al.*, 1991).

Actuellement plus de la moitié des isolats cliniques de pneumocoque sont résistants à la pénicilline G, et certains le sont à toutes les β -lactamines. Le pneumocoque a également rapidement acquis des résistances à plusieurs familles d'antibiotiques : aux sulfamides en 1943, à la tétracycline en 1963, à l'érythromycine en 1967 et au chloramphénicol en 1970 (Klugman, 1990). Il existe une grande disparité des souches résistants selon les pays pouvant aller de 5% dans des pays tels que la Norvège, la Hollande et l'Allemagne, et jusqu'à 60% en Espagne ou en France.

Le réseau mondial PMEN (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network <http://www.sph.emory.edu/PMEN/index.html>) recense les clones résistants dans le monde et les classe selon une nomenclature : « région ou pays ^{sérotype déterminé} -numéro d'entrée dans la base » ; au 1^{er} mai 2004 on recensait 26 clones résistants à la pénicilline ou multirésistants à plusieurs familles d'antibiotiques.

I.5.2 Les mécanismes moléculaires de la résistance aux β -lactamines.

Selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA/SFM), les souches de pneumocoque peuvent être classées selon leur concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est à dire la plus faible concentration en antibiotique qui stoppe la croissance bactérienne. Les souches sensibles à la pénicilline G ont une CMI $\leq 0,06$ mg/l, les souches intermédiaires $0,12$ mg/ml \leq CMI ≤ 1 mg/ml et les souches résistants possèdent une CMI ≥ 1 mg/ml.

Du point de vue du pneumocoque, les mécanismes d'acquisition de la résistance sont naturels, puisque comme toutes les bactéries, elle possède une plasticité de génome, c'est-à-dire une capacité naturelle à évoluer.

L'acquisition de la résistance a plusieurs origines, notamment chromosomique. Le pneumocoque, naturellement compétent, a la capacité d'acquérir des blocs de gènes provenant d'autres streptocoques pour créer des gènes mosaïques (Smith *et al.*, 1991). Cette acquisition exogène conduit à l'altération de protéines impliquées dans les dernières étapes de la biosynthèse de la paroi bactérienne et cibles des antibiotiques de la famille des β -lactamines : les « Penicillin-Binding Proteins (PBP) » dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi diminuée. Ce mécanisme est décrit au paragraphe III.3.3.1.

I.6. Les approches pour combattre la résistance.

Le développement de souches bactériennes résistantes est un phénomène naturel mais qui a été largement amplifié et accéléré par l'utilisation excessive d'antibiotiques, notamment en médecine vétérinaire.

Les bactéries pathogènes développent des arsenaux de résistance toujours plus performants et la course entre la découverte de nouvelles molécules et les apparitions de résistance à ces mêmes molécules est serrée. Nous avons atteint un stade critique où ces phénomènes deviennent un problème de santé publique et où l'aire des antibiotiques, inaugurée au milieu du 20^e siècle, pourrait bientôt être dépassée. Les réponses passent par des changements de comportement au niveau des thérapies humaine et animale ainsi que par des efforts de la communauté scientifique pour enrayer ce phénomène.

Parmi les approches pour combattre la résistance, on peut considérer un premier axe de recherche pour lequel l'objectif est de modifier les cibles connues des antibiotiques. Pour cela, il est indispensable de comprendre les mécanismes de résistance au niveau moléculaire par une caractérisation structurale, pour pouvoir modifier chimiquement les antibiotiques existants ou créer de nouvelles molécules avec une action différente. Cet axe s'applique concrètement aux PBP qui sont les cibles des antibiotiques de la famille des β -lactamines et pour lesquelles les mutations ponctuelles à travers les gènes modifient l'affinité.

Une deuxième approche consiste en la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques que seraient les enzymes impliquées dans des processus essentiels à la survie de la bactérie et inexistantes chez l'homme. En particulier, on peut cibler le complexe macromoléculaire de la division cellulaire et les facteurs de virulence situés en surface. Les avancées considérables

concernant les séquençages de génomes microbiens (<http://www.tigr.org>) ont permis entre autre d'identifier de nombreuses séquences de protéines assimilables à des facteurs de virulence, candidats potentiels pour l'élaboration de nouveaux antibiotiques ou de vaccins. Dès qu'une nouvelle cible est identifiée et caractérisée de façon fonctionnelle, elle peut faire l'objet d'un criblage rapide par une multitude de molécules chimiques pouvant inhiber son activité. La caractérisation structurale de la cible avec et sans ligand permet ensuite de modifier la nouvelle molécule par des cycles de chimie combinatoire et de modélisation moléculaire. L'étape suivante consiste en la détermination des caractéristiques pharmacocinétiques du composé, puis suivent les tests en modèle animal et enfin les tests humains en phases cliniques (Di Guilmi and Dessen, 2002).

Il est important de préciser que la mise au point d'un nouvel antibiotique est difficile et coûteuse. En effet, la mise en circulation de nouveaux médicaments nécessite entre 8 et 12 ans de contrôles et de recherches (Figure 2) après la première étape de découverte d'une première molécule. Pendant cette période, il est probable que de nouveaux mécanismes de résistances soient apparus, et que les nouveaux inhibiteurs ainsi testés soient devenus obsolètes (DiMasi *et al.*, 2003). Les recherches de nouvelles cibles et de nouvelles molécules sont donc coûteuses en temps et en ressources. Ceci se traduit par un développement de nouveaux antibiotiques moins productif que dans les années 1940-1960. En effet, entre 1998 et 2002, seulement 7 nouveaux antibiotiques ont été introduits sur le marché.

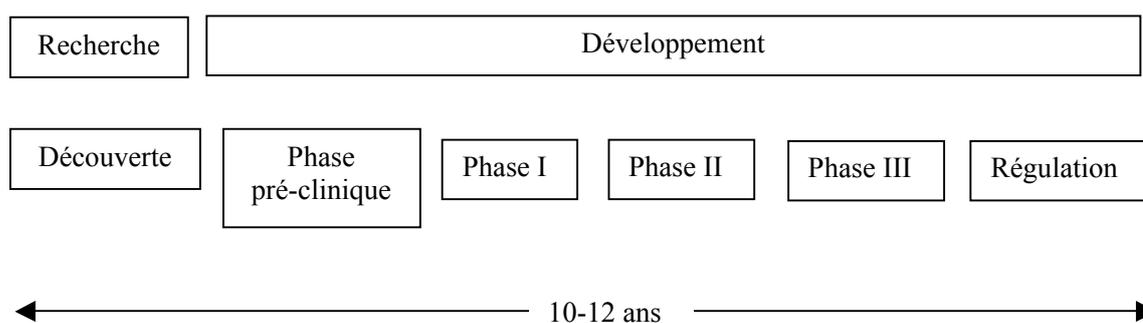


Figure 2 : Vue schématique des étapes de la découverte et du développement d'un nouveau médicament. Adapté de (Thomson *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, la communauté européenne a mis en place de nombreux réseaux pour combattre ces phénomènes de résistance, en particulier le réseau EUR-INTAFAR (Inhibition of New Targets for Fighting Antibiotic Resistance), associant 16 laboratoires européens et financé à hauteur de 11.300.000 euros par le 6^e Programme-Cadre de Recherche et Développement européen. L'objectif de ce consortium est d'enrichir l'arsenal thérapeutique en caractérisant de nouvelles cibles et en synthétisant de nouvelles molécules. Les 16

partenaires européens dont nous faisons partie, œuvrent à la première étape de l'élaboration du médicament par la détermination des cibles, la modification des antibiotiques existants et l'élaboration de nouvelles molécules chimiques par des moyens biochimiques, microbiologiques, structuraux ou chimiques pour pouvoir, d'ici 5 ans, aboutir à l'identification de nouvelles molécules potentiellement inhibitrices.

La cible choisie par l'organisation EUR-INTAFAR inclue les enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane.

II. Le peptidoglycane

II.1. Localisation et fonctions du peptidoglycane

Le peptidoglycane, ou muréine, est un maillage tridimensionnel organisé en une ou plusieurs couches, situé sur la face externe de la membrane cytoplasmique des bactéries et pouvant représenter jusqu'à 95% du poids de la paroi. Les bactéries Gram positives possèdent une épaisse couche de peptidoglycane (20-80 nm) contenant des acides téichoïques et lipotéichoïques, conférant à la bactérie ses propriétés antigéniques. En revanche les bactéries Gram négatives possèdent une membrane externe qui entoure une fine couche de peptidoglycane (1-7 nm) au niveau d'un espace périplasmique situé entre les membranes internes et externes (Beveridge, 1981; Yao *et al.*, 1999) (Figure 3). L'interrogation concernant la présence ou non d'un espace périplasmique chez les bactéries Gram positives a récemment été levée. En effet, deux études récentes ont montré par cryo-microscopie électronique l'existence d'un espace périplasmique entre la couche épaisse de peptidoglycane et la membrane cytoplasmique des bactéries Gram positives *B. subtilis* (Matias and Beveridge, 2005) et *S. aureus* (Matias and Beveridge, 2006), ceci malgré l'absence de membrane externe délimitant généralement cet espace chez les bactéries Gram négatives.

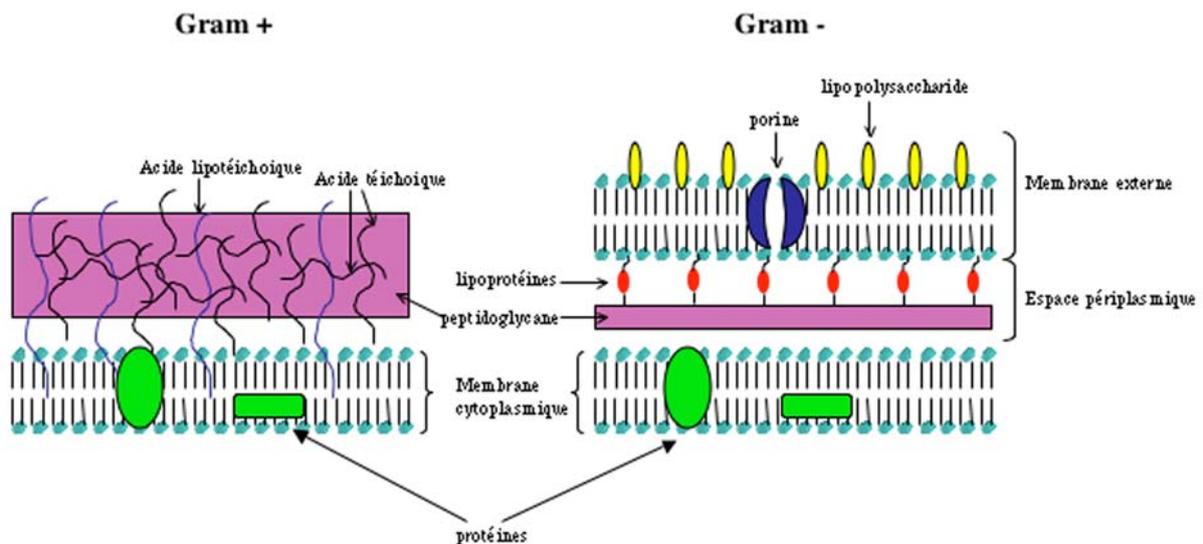


Figure 3 : Représentation schématique de la composition de la paroi des bactéries Gram+ et Gram-.

Le peptidoglycane est indispensable pour maintenir l'intégrité cellulaire en protégeant la membrane cytoplasmique contre la pression osmotique interne. Il est également essentiel

dans les étapes de division cellulaire, puisqu'il participe à maintenir la morphologie des bactéries filles et permet à la bactérie de s'adapter aux modifications morphologiques dues à des conditions de stress. En outre le peptidoglycane correspond à un site d'accroche pour les facteurs de virulence et les adhésines.

Son absence fragilise fortement l'intégrité cellulaire de la bactérie provoquant dans la plupart des cas la lyse cellulaire et la mort (Höltje, 1998; Nanninga, 1998).

II.2. Composition chimique

Le peptidoglycane est un hétéropolymère de chaînes de sucres et de peptides, résultant de la polymérisation et de l'incorporation au peptidoglycane existant d'un précurseur disaccharide-pentapeptide grâce à des réactions de transglycosylation et de transpeptidation. Les chaînes de sucres sont constituées de répétitions de disaccharides composés de l'acide *N*-acétyl-muramique (MurNAc) et de la *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) reliés entre eux par des liaisons glycosidiques β -1,4. Les chaînes de sucres sont ensuite pontées entre elles par des chaînes peptidiques qui prennent naissance au niveau de la fonction carboxyle de l'acide *D*-lactique de l'acide *N*-acétyl-muramique (Labischinski, 1994).

L'ultrastructure du peptidoglycane est caractérisée par une certaine rigidité due aux chaînes de sucres, pour lesquelles seule une légère rotation de la liaison β -1,4 est possible, ce qui permet à la paroi de supporter les différences de pression osmotique entre les milieux internes et externes. D'autre part, lors des étapes de division cellulaire, la paroi subit des extensions, phénomènes possibles grâce à l'élasticité conférée aux connections peptidiques, permettant une extension d'un facteur 3 entre les formes compactes et dépliées (Braun *et al.*, 1973; Isaac and Ware, 1974; Koch and Woeste, 1992).

II.3. Voie de biosynthèse du peptidoglycane

II.3.1. Les étapes cytoplasmiques

La synthèse du peptidoglycane est initiée dans le cytoplasme par les enzymes de la famille Mur, catalysant la formation de l'uridine diphosphate (UDP)-MurNAc à partir du précurseur UDP-GlcNAc (MurA et MurB), puis l'addition successive de 5 acides aminés sur

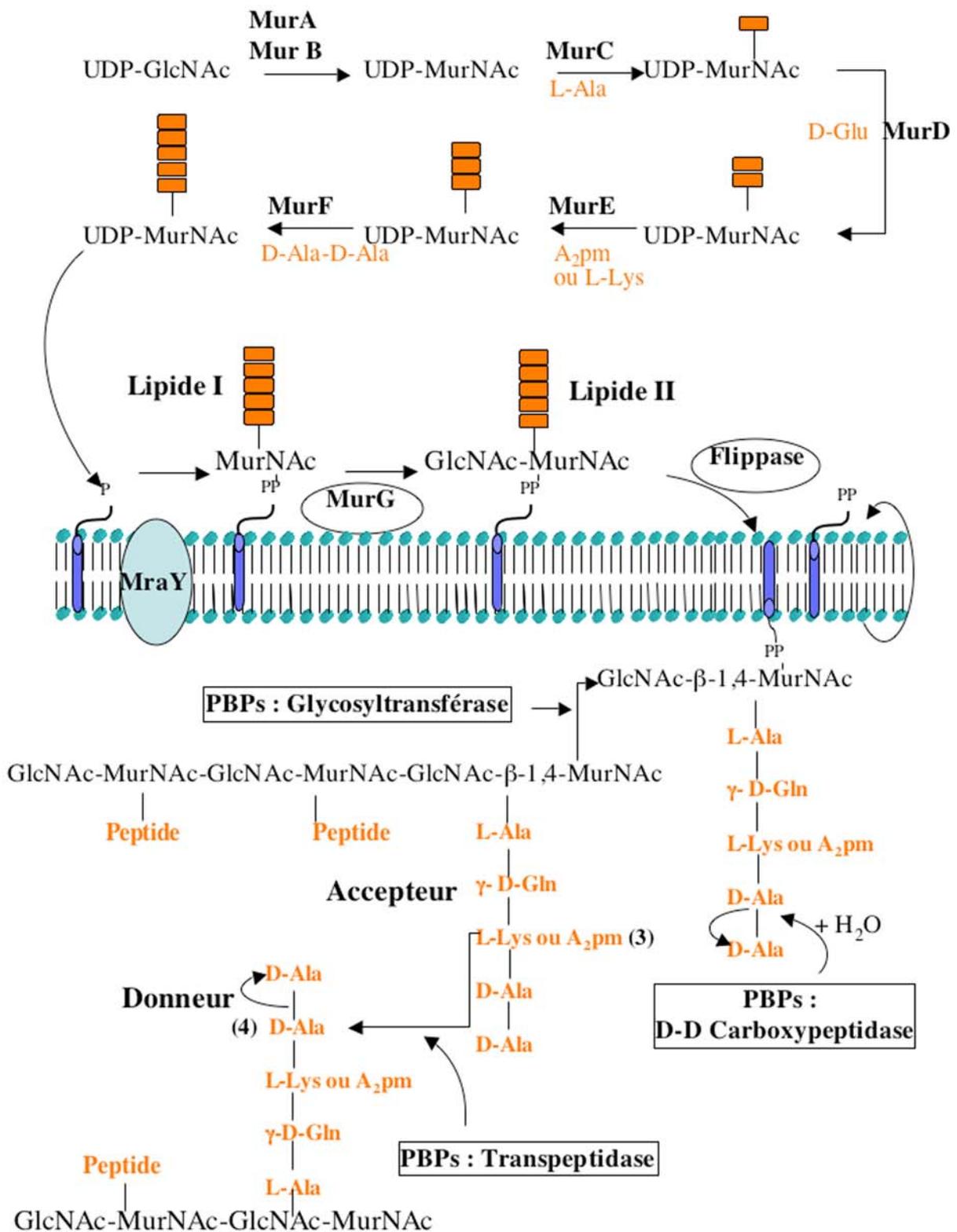


Figure 4 : Représentation schématique de la synthèse du peptidoglycane. Les précurseurs sont synthétisés et assemblés lors des étapes cytoplasmiques puis associés à un groupement undécaprényl-phosphate (formant le lipide I) et au groupement GlcNAc pour former le lipide II. Ce dernier est transloqué à travers la membrane pour devenir le substrat des activités glycosyltransférase et transpeptidase portées par les PBP (Macheboeuf *et al.*, 2006).

le groupement lactique de l'UDP-MurNAc (de MurC à MurF) (van Heijenoort, 2001b) (Figure 4).

La séquence peptidique varie en fonction de l'espèce bactérienne mais est invariablement terminée par un groupement D-alanyl-D-alanine, exception faite de certaines souches d'entérocoques résistantes à la vancomycine, pour lesquelles le groupement final est D-alanine-D-lactate (Arthur *et al.*, 1998; Lessard and Walsh, 1999).

La molécule soluble, UDP-MurNAc-pentapeptide est par la suite associée à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'un groupement undécaprényl pyrophosphate à 55 carbones, ceci grâce à la protéine MraY à 10 hélices transmembranaires (Bouhss *et al.*, 2004; van Heijenoort, 2001b). Le lipide I ainsi formé est pris en charge par la protéine MurG, une *N*-acétylglucosaminyl transférase, qui ajoute le groupement soluble UDP-GlcNAc. Cette nouvelle molécule appelée lipide II représente le précurseur disaccharidique de la synthèse du peptidoglycane au niveau des étapes périplasmiques.

Le mécanisme enzymatique des étapes cytoplasmiques de synthèse sont relativement bien connues en raison de la solubilité des enzymes Mur permettant la détermination des structures cristallographiques à haute résolution. En revanche, l'étape permettant à la molécule de lipide II de traverser la membrane cytoplasmique n'est pas connue et pourrait impliquer les protéines intégralement membranaires FtsW et/ou RodA (Höltje, 1998; Nanninga, 1998) qualifiées de « flippases ».

II.3.2. Les étapes périplasmiques

La deuxième étape de la biosynthèse du peptidoglycane concerne la polymérisation des unités disaccharidiques au niveau de la surface externe de la membrane cytoplasmique, la liaison entre les peptides et l'incorporation du nouveau matériel au sein du peptidoglycane préexistant. La polymérisation des unités disaccharidiques est effectuée par des activités de type glycosyltransférase (GT) et précède le pontage de ces chaînes (van Heijenoort, 2001a). L'activité de transpeptidation (TP) est non seulement impliquée dans l'étape de réticulation des chaînes de sucre mais également dans le transfert du nouveau matériel au sein du peptidoglycane préexistant (van Heijenoort, 2001a). Les activités distinctes GT et TP sont portées par des enzymes à ancrage membranaire, les Penicillin-Binding Proteins (PBP), dont les domaines catalytiques sont situés au niveau du périplasme.

Au cours de la transglycosylation, le disaccharide-pentapeptide est intégré à une chaîne glucidique via la formation d'une liaison β -1,4 entre deux résidus successifs de MurNAc et de GlcNAc (Figure 5).

La réaction de transpeptidation implique deux étapes distinctes. Dans un premier temps, on assiste à la rupture de la liaison covalente entre les deux derniers D-alanines d'un pentapeptide donneur, libérant l'énergie nécessaire à la formation d'une liaison covalente entre le pénultième D-alanine et la sérine active de l'enzyme avec départ de la dernière D-alanine (Figure 5).

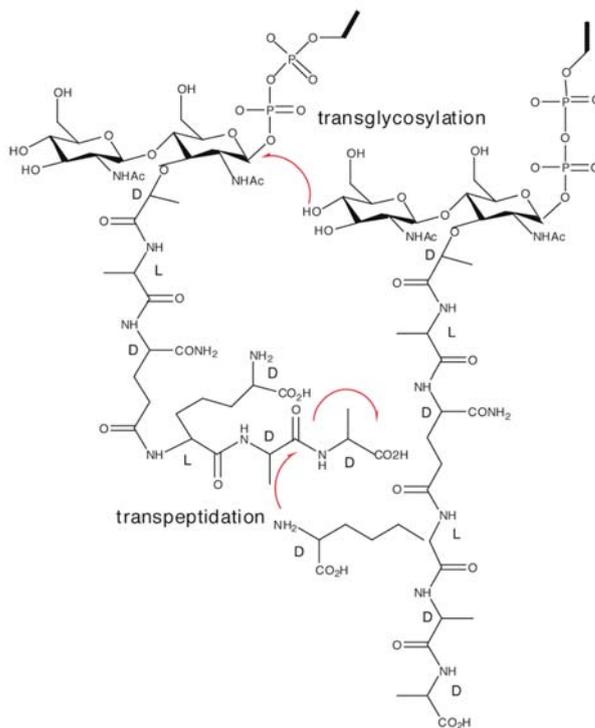


Figure 5 : Réactions chimiques de transglycosylation et transpeptidation chez *E. coli*.

Dans une deuxième étape, le groupement muréine-tétrapeptide est transféré à un groupement amine primaire d'un résidu en position 3 d'une chaîne voisine (Figure 5). Le groupement accepteur peut être sous la forme tri-tétra ou pentapeptidique. Le produit final possède une liaison peptidique entre le carbone du carbonyl d'un résidu D-alanine d'un peptide donneur dont le résidu en position 3 possède un groupement ϵ -aminé libre, et un résidu en position 3 d'une chaîne adjacente (Höltje, 1998).

D'autres enzymes sont nécessaires à la maturation du peptidoglycane : des GT lytiques qui permettent le clivage des chaînes polysaccharidiques du polymère, des D,D-carboxypeptidases (CP) responsables de la rupture de la liaison entre les deux derniers résidus D-alanines permettant de réguler le taux de réticulation, des endopeptidases qui catalysent la

rupture des liaisons peptidiques et des L,L-CPases responsables de la liaison 3-3 présentée dans le chapitre suivant (II.3.3.).

II.3.3. Nature du pentapeptide

La nature des chaînes peptidiques varie selon les espèces en particulier au niveau du résidu en position 3 qui peut être une lysine chez *S. pneumoniae* ou un acide mésodiaminopimélique chez *E. coli*. Chez *S. pneumoniae*, le pentapeptide est composé de l'alternance de L-alanine, γ -D-isoglutamine, L-lysine, D-alanyl-D-alanine, les deux derniers résidus (D-alanyl-D-alanine) étant rarement présents dans la composition chimique du peptidoglycane du pneumocoque. La paroi du pneumocoque sauvage après traitement par des amidases autolytiques est constituée de 40% de monomères tripeptidiques (Figure 6A), de 50% de dimères tri-térapeptidiques (Figure 6B-C) et de 10% de trimères (Figure 6D) (Garcia-Bustos *et al.*, 1987).

Le pontage des peptides s'effectue généralement entre le troisième acide aminé basique d'une chaîne et le quatrième acide aminé d'une chaîne voisine, une D-alanine. Certaines variations structurales sont possibles au niveau du polymère, telles que des acétylations, phosphorylations des unités polysaccharidiques ou bien des insertions de résidus entre ceux impliqués dans la liaison peptidique. La liaison entre deux chaînes adjacentes ne s'effectue plus alors de façon directe, mais branchée par un pont interpeptidique de longueur et de composition variable. Chez les streptocoques, par exemple, les enzymes MurM et MurN catalysent l'addition de peptides courts (serine-alanine ou di-alanines) au niveau du groupement ϵ -aminé de la lysine (Figure 6) ; chez les staphylocoques, le même résidu est « décoré » d'une chaîne pentaglycines par les enzymes FemX, FemA et FemB. Chez les entérocoques, la même lysine est liée soit à une asparagine soit à un acide aspartique (van Heijenoort, 2001b). Ces phénomènes semblent être liés à une augmentation des niveaux de résistance ; en effet de nombreuses souches de streptocoques résistants possèdent des peptides « branchés » et l'inactivation des gènes MurM et MurN permet la synthèse de peptides non branchés et la réversion du phénotype de résistance (Filipe and Tomasz, 2000). Une des hypothèses avancées serait une meilleure accommodation de ces substrats branchés au niveau des sites catalytiques modifiés des « Penicillin-Binding Proteins » devenues résistantes (Garcia-Bustos and Tomasz, 1990).

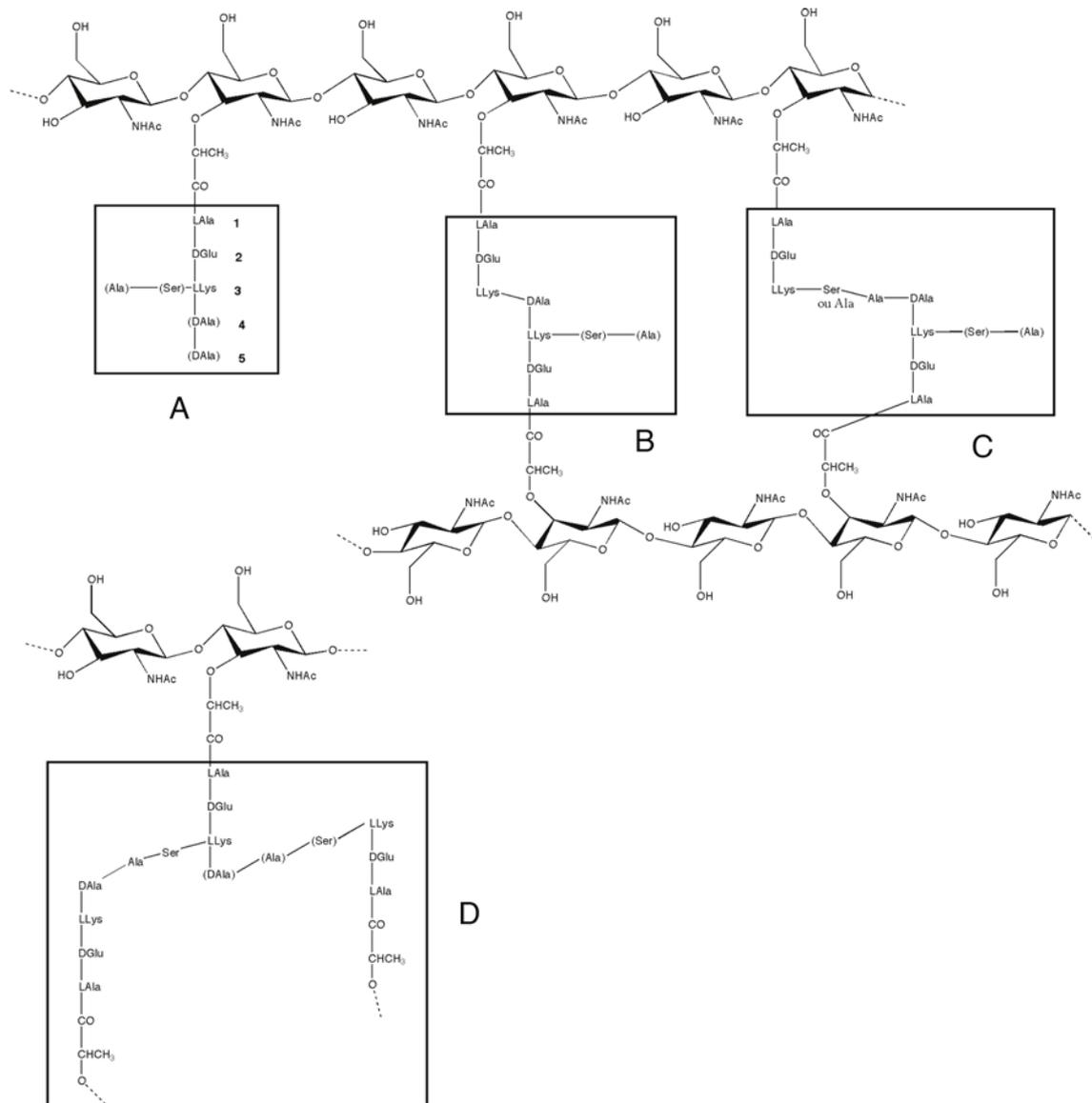


Figure 6 : Composition chimique du peptidoglycane de *S. pneumoniae*. Les unités disaccharidiques sont composées de l'acide *N*-acétyl-muramique (MurNAc) et de la *N*-acétyl-glucosamine (GlcNAc) avec des extensions peptidiques assemblées en monomères penta- ou tripeptidiques (A), en dimères tri-térapeptidiques (B et C) et en trimères (D). Les liaisons entre 2 chaînes adjacentes peuvent être directes (B) ou branchées (C et D). Les résidus présents de manière facultative sont indiqués entre parenthèses.

Récemment, un nouveau mécanisme de résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines a été mis en évidence chez *E. faecium*, où la liaison entre les résidus en position 3 d'une chaîne et en position 4 d'une chaîne adjacente est hydrolysée pour être reformée entre les deux résidus en position 3 des deux chaînes et former un pontage 3-3 de type L-lys, D-asx, L-lys (Mainardi *et al.*, 2005; Mainardi *et al.*, 2000; Mainardi *et al.*, 2002)

II.4. Ultrastructure du peptidoglycane, les différents modèles en jeu

Les deux modèles classiques d'organisation du peptidoglycane divergent et malgré les nombreuses expériences biochimiques, de microscopie électronique, de cristallographie des rayons X et de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), aucun modèle n'est capable de satisfaire entièrement aux données expérimentales. Une vue classique de l'architecture est représentée par l'arrangement des chaînes glycanes parallèlement à la membrane cytoplasmique formant une monocouche chez les bactéries Gram négatives et une multicouche chez les bactéries Gram positives. Ce modèle est en accord avec les données expérimentales déterminant la quantité de peptidoglycane, son épaisseur et son degré de réticulation (Vollmer and Holtje, 2004). Un deuxième modèle d'organisation, le « scaffold model », propose une organisation des chaînes glycanes perpendiculairement à la membrane cytoplasmique (Dmitriev *et al.*, 1999; Dmitriev *et al.*, 2000; Dmitriev *et al.*, 2003) produisant une matrice à la fois plus élastique, poreuse, compacte et ajustable que le modèle précédent (Dmitriev *et al.*, 2005).

Les deux modèles s'accordent sur le fait que les chaînes saccharidiques ont une symétrie d'ordre 4. Ceci entraîne que les peptides reliés aux chaînes glycanes possèdent un arrangement hélicoïdal le long de ces chaînes et sont incrémentées de 90° à chaque unité disaccharidique. Dans ce cas, un arrangement en monocouche implique le pontage entre 2 chaînes voisines toutes les 4 unités disaccharidiques (Labischinski *et al.*, 1991) tandis que l'arrangement en multicouche suppose un plus haut degré de réticulation. En effet le degré de réticulation des bactéries Gram négatives est de 25-50% (Glauner *et al.*, 1988) alors que celui des bactéries Gram positives est de 70-90% (Labischinski, 1994). Une récente étude d'un fragment de peptidoglycane par RMN propose un arrangement des chaînes de sucres en hélice avec une symétrie d'ordre 3. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un pontage incomplet des chaînes permettant la formation de pores compris entre 70 et 120 Å pouvant accommoder les protéines responsables de la biosynthèse de la paroi (Meroueh *et al.*, 2006).

III. Les Penicillin-Binding Proteins (PBP)

La mise en évidence des PBP comme acteur principal des réactions de transpeptidation a débuté dans les années 1960 lorsque Tipper et Strominger ont proposé que la pénicilline agisse sur la formation de la paroi cellulaire par analogie entre le substrat des transpeptidases (le D-alanyl-D-alanine) et le cycle β -lactame des pénicillines (Tipper and Strominger, 1965). Plus tard, ils découvrent l'existence de peptides non branchés dans des cultures de *S. aureus* traitées avec des concentrations de pénicilline inférieures à la concentration létale (Tipper and Strominger, 1968). Enfin leur nom est définitivement adopté au cours d'expériences de marquage à la pénicilline radioactive ciblant les activités TP et CP.

Les PBP sont des enzymes ancrées, ou accolées à la membrane cytoplasmique, et dont les modules actifs sont situés dans l'espace extracellulaire périplasmique. Elles appartiennent à la super famille des protéines ASPRE (Active-Site Serine Penicillin Recognizing Enzymes) comprenant à la fois des transpeptidases, des carboxypeptidases et des β -lactamases. Cette super famille est caractérisée par des motifs structuraux classiques présentés plus loin (Goffin and Ghuysen, 1998).

III.1. Classification génomique et structurale

Les analyses de nombreuses séquences ont abouti à la classification des PBP en trois groupes (Goffin and Ghuysen, 1998) : les PBP de haut poids moléculaire elles-mêmes divisées en deux sous-groupes, les PBP de classe A, ou PBP bimodulaires, (HMW-A PBP pour High Molecular Weight class A PBP) et les PBP monofonctionnelles de classe B (HMW-B PBP), le troisième groupe étant représenté par les PBP de faible poids moléculaire (LMW PBP pour Low Molecular Weight PBP).

Les domaines TP sont caractérisés par trois motifs structuraux conservés le long de la séquence (Figure 7A), qui se retrouvent associés dans l'espace grâce au repliement tridimensionnel (Figure 7B) (Goffin and Ghuysen, 1998). Les éléments de structure secondaire suivent la nomenclature des β -lactamases de classes A (Lobkovsky *et al.*, 1993). Un premier motif catalytique S*xxK comportant la sérine active (S*) est situé au niveau de la partie N-terminale de l'hélice α_2 , au centre de la gorge enzymatique (boule rouge dans la figure 7B). Le deuxième motif SxN est situé sur une boucle entre les hélices α_4 et α_5 (sérine

représentée par une boule violette dans la Figure 7) et enfin le troisième motif KTG, sur le brin $\beta 3$ (Lysine représentée par une boule orange dans la Figure 7B).

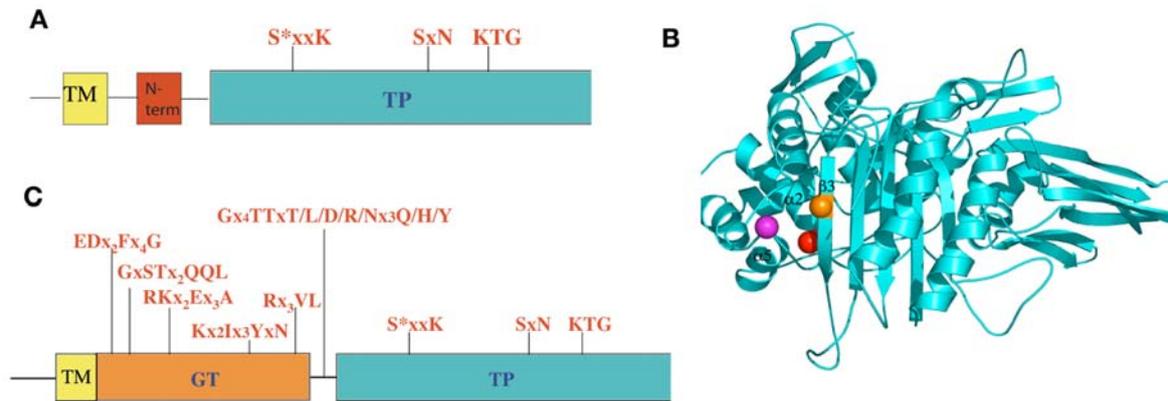


Figure 7 : Représentation de la topologie de séquences des PBP de classe A et de classe B

A : Les PBP de classe B sont composées d'une partie cytoplasmique, d'un domaine associé à la membrane cytoplasmique (en jaune) et d'un domaine transpeptidase catalytique (en bleu); les motifs conservés sont montrés en rouge ; x représente un acide aminé non conservé.

B : Structure cristallographique de PBP2x montrant l'arrangement des motifs conservés au sein de la cavité enzymatique. La sérine active est en rouge ; la sérine du deuxième motif SxN est en violet et la lysine du troisième motif KTG est en orange.

C : Arrangement des PBP de classe A comportant une partie cytoplasmique, un ancrage membranaire, un domaine GT catalytique (en orange) avec 5 motifs conservés en rouge, le domaine de liaison avec le sixième motif conservé et le domaine transpeptidase.

Le module GT est caractérisé par 5 motifs relativement conservés : ED_{x2}FX₄G (motif 1), GxST_{x2}QQL (motif 2), RK_{x2}EX₃A (motif 3), Kx₂Ix₃YxN (motif 4) et Rx₃VL (motif 5) (Figure 7C). Les domaines GT des PBP de classes A et les GT monofonctionnelles possèdent une homologie de séquence, permettant de les classer parmi la famille des GT51 dans la base de données répertoriant les différentes familles de GT (Coutinho *et al.*, 2003). Enfin, un sixième motif (Gx₄TTxT/L/D/R/Nx₃Q/H/Y) situé entre les domaines TP et GT, délimite cette région, dite de liaison (Figure 7C).

III.1.1. Les PBP de classe A

L'analyse de 213 séquences de génomes eubactériens, en dehors des variants résistants aux antibiotiques et des souches de mycoplasma (qui ne contiennent pas de peptidoglycane), montre l'existence de 430 séquences de HMW-A PBP (Figure 8). Les PBP de classe A, comme celles de classe B, possèdent une courte région cytoplasmique en position N-

terminale, une région transmembranaire et deux modules catalytiques : les domaines GT et TP.

III.1.1.1. Topologie

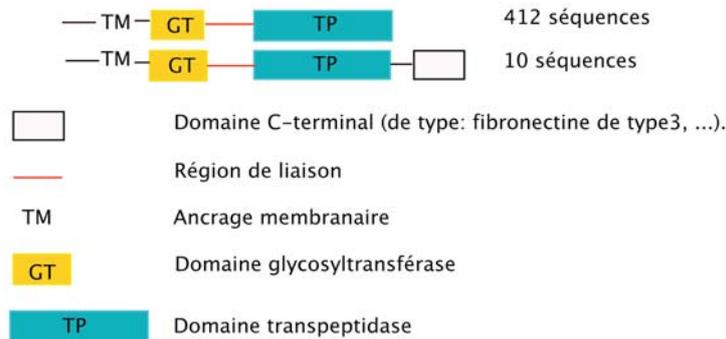
En 1998, l'analyse de séquence des 63 PBP disponibles à cette époque (dont 29 HMW-A PBP) (Goffin and Ghuysen, 1998) ont permis de dénombrer 5 sous-familles de PBP bimodulaires : pour les bactéries Gram négatives, les sous-classes A1 et A2 représentées respectivement par PBP1b et PBP1a d' *E. coli*, et pour les bactéries Gram positives, les sous-classes A3, A4 et A5 représentées respectivement par PBP1a, PBP2a et PBP1b de *S. pneumoniae*. Ces sous-classes forment des « clusters » qui se différencient par des insertions de séquences à certaines positions (Goffin and Ghuysen, 1998).

Il ressort de l'analyse de séquence qu'il existe de grandes variations selon les espèces au sein du domaine TP et une grande conservation du domaine GT. Cette dernière serait due au fait que la composition des chaînes de sucres au sein du peptidoglycane est identique entre espèces, ne demandant pas d'adaptation importante de la part des enzymes responsables de leur polymérisation. En revanche la nature des pentapeptides, substrats des TP, est disparate selon les espèces, ou même entre différentes souches résistantes (Goffin and Ghuysen, 2002).

On pourra noter que les bactéries peuvent également contenir dans leur génome des GT monofonctionnelles (MGT) qui sont caractérisées par une unité GT associée à la membrane et comportant les mêmes motifs conservés que les domaines GT des HMW-A PBP.

Bien que leur activité *in vivo* n'ait pas été clairement déterminée, leur activité GT *in vitro* suggère qu'elles puissent agir de concert avec les PBP bifonctionnelles lors des étapes de division cellulaire (Di Berardino *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001).

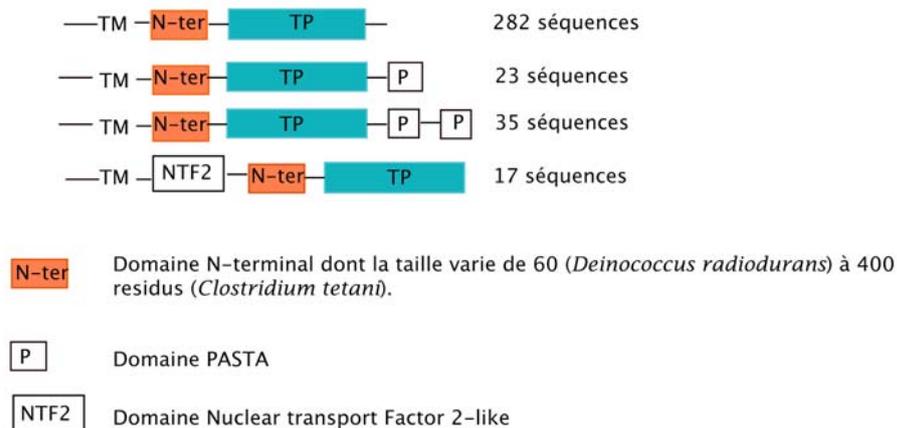
A. Enzymes de classe A



B. Mono Glycosyltransferases



C. Enzymes de classe B



D. DD-carboxypeptidases

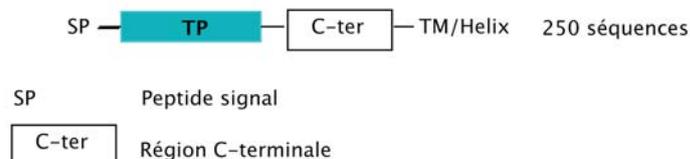


Figure 8 : Synthèse de l'analyse de 213 génomes uniques montrant l'assemblage des PBP en protéines multidomaines.

Toutes les familles de PBP sont ancrées à la membrane par une hélice transmembranaire ou une hélice amphipathique (Macheboeuf *et al.*, 2006)

Lefèvre *et al.* ont, les premiers, permis de déterminer une région de longueur variable située entre les domaines GT et TP de PBP1b d'*E. coli* n'ayant aucune activité enzymatique (Lefèvre *et al.*, 1997). Par la suite, les analyses de séquences par Ghuysen *et al.* ont révélé un

motif conservé au sein de ce domaine de liaison, appelé motif 6, caractérisé par la séquence $Gx_4TTxT/L/D/R/Nx_3Q/H/Y$ (Goffin and Ghuyesen, 1998) (Figure 7).

III.1.1.2. L'association des PBP de classe A avec la membrane rend leur étude structurale difficile

Les premiers essais de clonage et d'expression des PBP de classe A sous forme native, c'est-à-dire contenant à la fois les parties cytoplasmique, membranaire et périplasmique, ont aboutit pour l'ORF1 d'*Haemophilus influenzae* (Sharma *et al.*, 1995), PBP1 de *M. leprae* (Basu *et al.*, 1996), PBP1 de *N. meningitidis* (Ropp and Nicholas, 1997), PBP1 de *N. gonorrhoeae* (Ropp and Nicholas, 1997) et PBP1b d'*E. coli* (Chen *et al.*, 2003; Schwartz *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2001; Terrak *et al.*, 1999). Pour certaines d'entre elles il a été possible de caractériser les domaines GT biochimiquement, mais la nature membranaire de la protéine a ralenti fortement les études structurales. Par la suite, plusieurs groupes se sont attachés à exprimer la partie périplasmique des HMW-A PBP pour s'apercevoir que malgré l'absence de l'hélice transmembranaire les constructions semblaient garder un caractère hydrophobe. En effet, la purification de la partie soluble de PBP1b d'*E. coli* nécessite l'utilisation d'un détergent, le CHAPS, en proportion de 0,7% (Nicholas *et al.*, 1993). De plus la protéine peut être reconstituée dans des vésicules de lipide. De la même façon, à l'IBS, notre équipe n'a réussi à solubiliser PBP2a de *S. pneumoniae* qu'en présence de 0,5% CHAPS ; l'incorporation dans des vésicules lipidiques est également possible (Di Guilmi *et al.*, 1999). PBP1 de *M. leprae* s'agrège en absence de détergent (Mahapatra *et al.*, 2000) et l'enzyme monofonctionnelle glycosyltransférase de *S. aureus* est solubilisée en présence de 0,3% CHAPS (Terrak and Nguyen-Disteche, 2006). Les problèmes d'agrégation et d'instabilité des PBP en l'absence de leur ancrage membranaire semblent suggérer qu'il puisse exister un site secondaire d'accroche à la membrane, en plus de l'ancrage classique commun à toutes les PBP. Ces régions d'association à la membrane comporteraient seulement le premier motif conservé des GT pour PBP1b d'*E. coli* (Wang *et al.*, 1996) et PBP2a de *S. pneumoniae* (Di Guilmi *et al.*, 1999) alors que chez PBP1 de *mycobacterium leprae*, elles comporteraient les motifs 3, 4 et 5 (Mahapatra *et al.*, 2000).

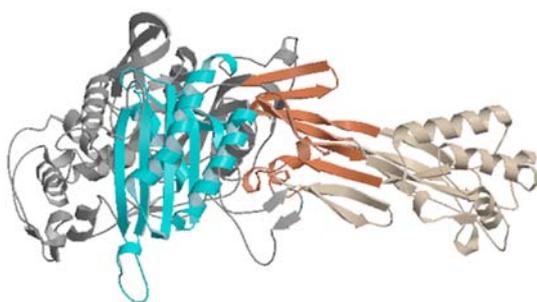
Aucune caractérisation de ces zones à spécificité hydrophobe n'est disponible à ce jour mais il est tentant de proposer un rôle pour les domaines GT de stabilisation des substrats lipidiques à localisation membranaire.

Récemment, trois groupes ont réussi à cloner et purifier des domaines extracellulaires de PBP de façon soluble, sans faire appel à des détergents, pour la forme périplasmique : pour PBP1b de *S. pneumoniae* (Di Guilmi *et al.*, 2003a), pour le domaine GT isolé de PBP1b d'*E. coli* (Barrett *et al.*, 2004) et pour PBP2 de *S. aureus* (Barrett *et al.*, 2005). Des résultats d'études cinétiques et de caractérisation fonctionnelle sont disponibles pour ces constructions mais à ce jour, aucune donnée structurale d'un domaine GT, d'une MGT ou d'une HMW-A PBP n'est disponible, rendant hypothétique la compréhension détaillée de l'activité glycosyltransférase lors de la synthèse du peptidoglycane.

III.1.2. Les PBP de classe B

350 séquences de PBP de classe B (HMW-B PBP) ont été identifiées dans l'analyse de 213 génomes. Elles se divisent en 4 sous-groupes (Figure 8C). Les quatre groupes ont en commun la présence d'un domaine catalytique TP responsable de la réticulation des chaînes peptidiques de la paroi et un domaine N-terminal dont la fonction est inconnue.

La première structure de HMW-B PBP a été résolue en 1996, PBP2x de *S. pneumoniae* (Parès *et al.*, 1996) et a révélé que le domaine N-terminal présentait une forme de pince à sucre, sans équivalent à l'époque dans les banques de données structurales (domaine représenté en rouille et beige dans la figure 9). La longueur de ce domaine peut varier de 60 résidus chez *Deinococcus radiodurans* (UNIPROT Q9RT97) à 400 résidus chez *Clostridium tetani* (UNIPROT Q892M5).



Streptococcus pneumoniae PBP2x

Figure 9 : Structures tridimensionnelles de PBP2x de *S. pneumoniae*.

Le domaine central conservé dans toute la famille ASPRE est représenté en cyan, le domaine N-terminal comportant les motifs conservés est coloré en rouille et les extensions N-terminales en beige (Macheboeuf *et al.*, 2006)

A partir d'alignements de séquences, des motifs conservés à l'intérieur de ce domaine N-terminal ont été identifiés (Goffin and Ghuysen, 2002) : les motifs 1 (**R**G_x**3**DRNG), 2 (**R**xYPxG) et 3 (Gx₂GxE_x**3**D), et, dans une moindre mesure, le motif 4 (GxDx₃TxDx₃Q) moins conservé. Les motifs 1, 2 et 3 sont représentés en rouille dans les figures 9 et 10. Ces derniers permettent la stabilisation du domaine N-terminal (Figure 10). L'agencement tri-

dimensionnel de trois résidus enfouis (identifiés en gras dans la séquence de chaque motif ci-dessus) permet de créer un point d'ancrage stabilisateur de la région N-terminale (Macheboeuf *et al.*, 2006).

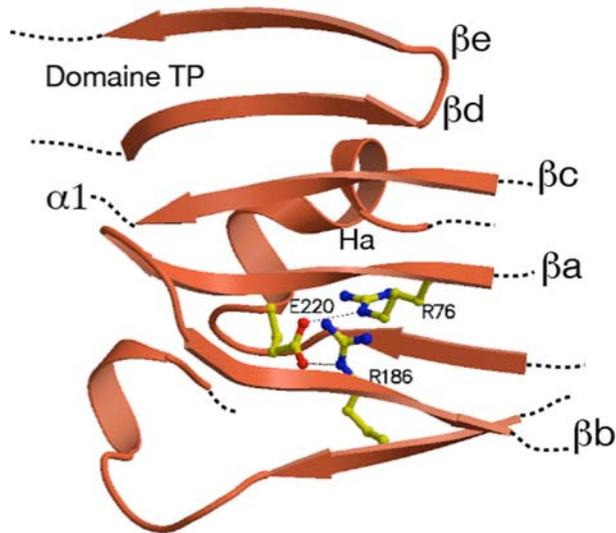


Figure 10 : Agrandissement de la région N-terminale de PBP2x de *S. pneumoniae*.

Les trois motifs classiques de cette région sont présents sur des brins β . Les trois résidus constituant un point d'ancrage stabilisateur de la région N-terminale sont représentés.

La différence de longueur entre les domaines N-terminaux dépend de la longueur des boucles (en beige dans la figure 9) connectées aux brins conservés (en rouille dans les figures 9 et 10). Lorsqu'on supprime ces boucles pour ne laisser que 2 ou 3 résidus connecteurs, la stabilité du domaine N-terminal est grandement augmentée, comme le montre la structure d'une « mini-PBP2x » (Dideberg *et al.*, 2003), ce qui laisse penser que les extensions connectrices N-terminales ne sont pas primordiales dans le maintien de la stabilité des PBP de classe B. La fonction de ce domaine reste inconnue. Il a toutefois été proposé qu'il puisse s'associer avec d'autres protéines du cycle cellulaire (Höltje, 1998). Il est possible d'envisager que le domaine N-terminal ait une fonction de sur-élévateur par rapport à la membrane pour positionner le domaine catalytique TP à une hauteur raisonnable pour effectuer sa fonction de réticulation des chaînes nouvellement synthétisées (Macheboeuf *et al.*, 2006).

Deux sous-groupes de PBP de classe B comprenant 58 séquences comportent en aval de leur domaine catalytique, un ou deux domaines de repliement α/β identifié comme étant un domaine PASTA (pour « PBP And Ser/Thr kinase Associated domain ») (Figure 8) (Yeats *et al.*, 2002). Il a été proposé que ce domaine soit un senseur du substrat des PBP (D-alanine-D-alanine et des antibiotiques) mais aucune preuve biochimique n'a encore étayé ce point.

Enfin le dernier groupe de PBP de classe B possède un domaine N-terminal de type NTF2 (pour « Nuclear Transport Factor 2 ») de fonction inconnue. La première structure d'un membre ce groupe est celle de PBP2a de *S. aureus* (Lim and Strynadka, 2002).

III.1.3. Les PBP de faible poids moléculaire

L'analyse des génomes a mis en évidence 250 séquences de PBP de faible poids moléculaire (LMW PBP) (Figure 8). Les principaux représentants de cette famille sont les CP responsables de l'hydrolyse de la liaison entre les deux derniers résidus D-alanine de la chaîne pentapeptidique du peptidoglycane ; elles sont inhibées par les antibiotiques de la famille des β -lactamines. Elles possèdent un domaine TP précédé d'un peptide signal clivable et une région membranaire leur permettant soit un ancrage soit une simple association à la membrane par une hélice C-terminale amphiphile (Figure 8).

Certaines structures à haute résolution sont connues pour les LMW PBP dont celles de PBP5 d'*E. coli* (Nicholas *et al.*, 2003), PBP4 de *S. aureus* (Rajashankar *et al.*, 2004) et PBP3 de *S. pneumoniae* (Morlot *et al.*, 2005). Ces structures nous révèlent que c'est un domaine C-terminal riche en feuillets β qui sépare la région catalytique de l'hélice amphiphile. Ce domaine peut être vu comme un piédestal permettant de moduler la hauteur du site catalytique par rapport à la membrane en fonction de l'accessibilité du substrat (Davies *et al.*, 2001; Morlot *et al.*, 2005). Dans ce cas, l'hélice amphiphile permettrait aux LMW PBP de glisser sur la surface de la membrane pour les amener sur le site de réaction (Morlot *et al.*, 2005).

Il faut également mentionner que les PBP de faible poids moléculaire de sous-classe C1 (Goffin and Ghuysen, 1998), comprenant PBP4 d'*E. coli*, PBP4a de *B. subtilis* et la transpeptidase R39 d'*Actinomyces* possèdent un domaine supplémentaire correspondant à la moitié d'un repliement de Rossmann. La fonction de cette région riche en brins β n'est pas claire mais sa surface hautement chargée a été proposée pour être une plate-forme permettant l'interaction avec d'autres protéines (Kishida *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2005).

III.2. Mécanismes réactionnels

La difficulté majeure rencontrée pour les études enzymatiques des PBP, tant au niveau de l'activité glycosyltransférase que transpeptidase, réside dans le fait que le substrat naturel des PBP, à savoir le lipide II, est présent en faible quantité dans la cellule (1000 à 2000 molécules par cellule) (van Heijenoort *et al.*, 1992) et que sa localisation membranaire en fait

un substrat difficile à purifier. Les premières tentatives pour isoler le lipide II dans les années 1980 ont permis d'ouvrir la voix à la caractérisation enzymatique des PBP.

III.2.1. Mécanisme catalytique des glycosyltransférases

III.2.1.1. Caractérisation de l'activité glycosyltransférase

Comme indiqué précédemment, la difficulté majeure pour étudier les PBP de classe A est le fait que les substrats naturels sont difficilement purifiables. Les premiers essais de production du substrat ont abouti à la purification d'un lipide II radiomarqué [¹⁴C]GlcNAc ou acide-[¹⁴C]-meso-diaminopimélique à partir des membranes d'*E. coli* (Terrak *et al.*, 1999; van Heijenoort *et al.*, 1992). Cette première purification s'est avérée lourde à mettre en place, avec le désavantage de ne pas pouvoir caractériser les produits de la réaction. Par la suite, plusieurs équipes se sont penchées sur la production de lipide II par la voie enzymatique grâce au couplage MraY/MurG (Breukink *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2001). Cette méthode procure un excellent rendement, mais des produits peu purs. Enfin la synthèse chimique totale de lipide II par (Schwartz *et al.*, 2001; VanNieuwenhze *et al.*, 2002) permet d'obtenir des produits purs en faible quantité. C'est cette dernière méthode qui a été la plus largement utilisée pour développer les tests fonctionnels concernant les glycosyltransférases.

Les premiers test d'activité des GT ont été réalisés sur les enzymes d'*E. coli* PBP1b native, possédant son ancrage membranaire et solubilisée en détergent (Suzuki *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1980; Tamura *et al.*, 1980), PBP1a native (Ishino *et al.*, 1980) et PBP1c native (Schiffer and Holtje, 1999). Plus tard, la mise en place de tests fonctionnels a permis de caractériser de façon cinétique les interactions entre les domaines GT et les molécules de lipide II ; le plus utilisé est basé sur les modifications des intensités de fluorescence en fonction des variations de l'hydrophobicité de l'environnement du substrat (Schwartz *et al.*, 2002). Le lipide II utilisé dans ce test, est modifié par un groupement dansyl fluorescent, lié de façon covalente sur la lysine en position 3. La fluorescence augmente en présence de groupements hydrophobes. Le couplage de la réaction avec une muramidase permet de libérer des monomères [GlcNAc-MurNAc-pentapeptide], ce qui entraîne une diminution de l'intensité de fluorescence (Schwartz *et al.*, 2002). Plusieurs équipes ont déterminé les paramètres cinétiques de la réaction de transglycosylation pour PBP1b d'*E. coli* (Barrett *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2002; Terrak *et al.*, 1999). En particulier, il a été montré par délétion du domaine TP, que celui-ci n'intervenait pas dans la capacité du domaine GT à polymériser des

chaînes glycanes (Barrett *et al.*, 2004). Les dernières avancées sur PBP1b ont permis d'affiner la technique en analysant directement par HPLC les produits issus des digestions par les muramidases, ce qui a permis de gagner en résolution et de visualiser la polymérisation du lipide II *in vitro* avec jusqu'à 25 disaccharides (Bertsche *et al.*, 2005).

Récemment, deux nouvelles purifications et caractérisations cinétiques de domaines GT de HMW-A PBP ont été publiées, pour PBP2 de *S. aureus* (Barrett *et al.*, 2005) et PBP4 de *Listeria monocytogenes* (Zawadzka-Skomial *et al.*, 2006).

Les trois HMW-A PBP de *S. pneumoniae* ont été étudiées à l'IBS. Il a été montré que PBP1a était capable de fixer l'antibiotique moénomycine (Di Guilmi *et al.*, 1998), que PBP1b était capable de fixer le lipide II dansylé (Di Guilmi *et al.*, 2003a) et enfin que PBP2a était capable de synthétiser des chaînes glycaniques à partir de lipide II dansylé mais avec une activité catalytique 10^7 fois inférieure à celle de PBP1b d'*E. coli* (Di Guilmi *et al.*, 1999).

Des expériences similaires ont été effectuées sur des glycosyltransférases monofonctionnelles (MGT), soit en présence de détergent pour la MGT d'*E. coli*, capable de synthétiser du peptidoglycane non réticulé à partir de lipide II radiomarqué (Di Berardino *et al.*, 1996), soit sous forme soluble pour la MGT de *S. aureus* (Terrak and Nguyen-Disteche, 2006; Wang *et al.*, 2001).

III.2.1.2. Mécanisme de la réaction de transglycosylation

La nature du mécanisme de la réaction GT est controversée, et deux interprétations ont émergé (Figure 11).

Dans le premier mécanisme, la chaîne glycanique en croissance, ancrée à l'undécaprényl pyrophosphate, constituerait le substrat donneur et serait transférée vers le substrat accepteur lipide II, au niveau du groupement hydroxyle en C4 de son extrémité GlcNAc (1 dans Figure 11). Ce mécanisme a été établi chez deux bactéries Gram positives : *Bacillus licheniformis* et *Micrococcus luteus* (Ward and Perkins, 1973; Weston and Perkins, 1977). Dans la deuxième interprétation, le lipide II est considéré comme le substrat donneur et son disaccharide-pentapeptide serait transféré vers la chaîne glycanique acceptrice au niveau du groupement hydroxyle de C4 de son groupement GlcNAc (2 dans Figure 11).

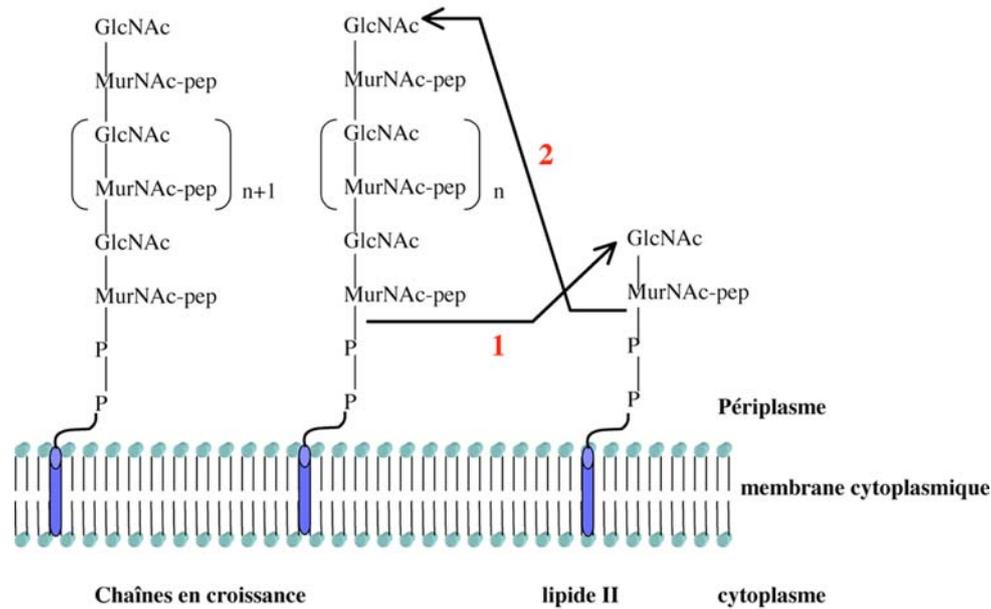


Figure 11 : Représentation schématique de l'extension des chaînes glycanes par les GT.

1 : Elongation avec le lipide II comme molécule acceptrice ; 2 : Elongation avec la chaîne en croissance comme accepteur. D'après (van Heijenoort, 2001). Abréviation : pep : peptide ; P : groupement phosphate

Très récemment, (Fraipont *et al.*, 2006) indiquaient que PBP1b d' *E. coli* semble préférer comme molécule acceptrice une molécule contenant un ancrage lipidique ; en revanche, la molécule donneuse requiert un GlcNAc, un MurNAc, un groupement réactif au niveau du carbone C1 du MurNAc, mais pas forcément de chaîne lipidique. Cette observation conforte l'hypothèse 1 de la Figure 11.

Par ailleurs, il a été proposé que les domaines TP sont capables de réticuler des chaînes oligosaccharidiques mais pas les précurseurs disaccharidiques (Bertsche *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 1984; Schwartz *et al.*, 2001; Terrak *et al.*, 1999), ce qui indique que la polymérisation du lipide II pour former les chaînes glycanes du peptidoglycane s'effectue avant la réticulation des ponts peptidiques.

Au niveau mécanistique, une glycosyltransférase catalyse le transfert d'un saccharide entre un sucre donneur activé et un accepteur saccharidique, protéique, lipidique ou nucléotidique soit avec une inversion de la stéréochimie du carbone en C1 du sucre donneur, soit avec la rétention de sa conformation. Le lipide II possède un carbone C1 en position α , alors que la liaison disaccharidique est caractérisée par une liaison β -1,4 entre le MurNAc et le GlcNAc. En d'autres termes, la réaction GT est caractérisée par une inversion de la configuration du carbone C1 et implique probablement une attaque directe du substrat

accepteur sur le substrat donneur.

Aucune structure tridimensionnelle de domaine GT n'est à ce jour disponible. Cependant on peut se baser sur la structure de Slt70, une N-acétylmuramidase catalysant a réaction inverse de la réaction GT en réalisant la réaction de clivage des liaisons β -1,4 entre les chaînes glycanes pour libérer des unités disaccharidiques (Thunnissen *et al.*, 1995).

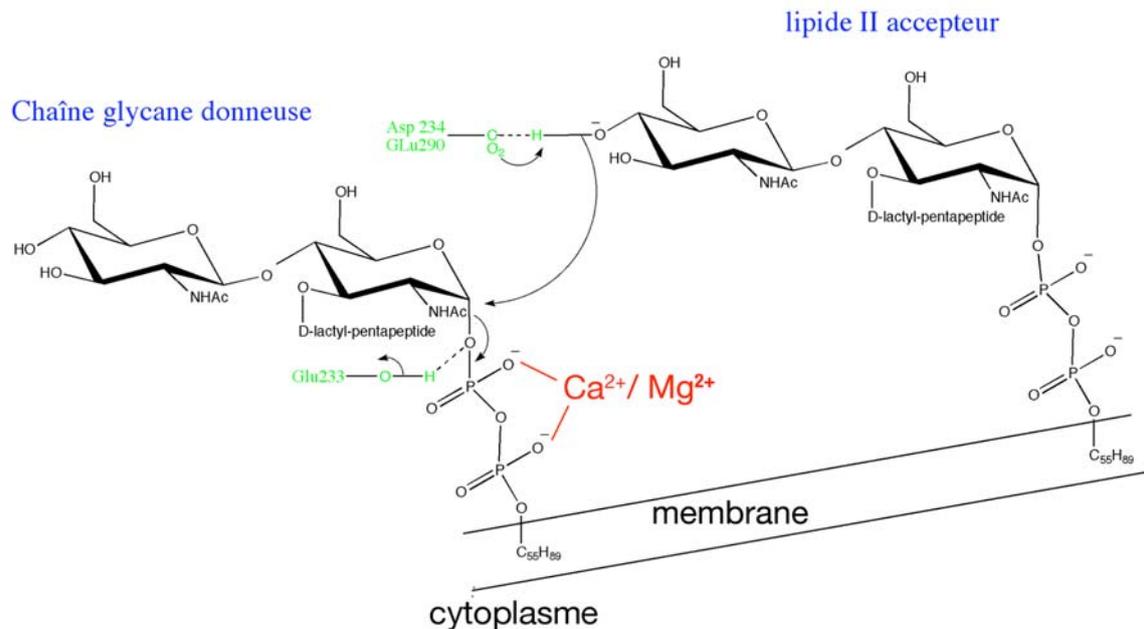


Figure 12 : Proposition d'un mécanisme catalytique pour les GT.

Les résidus pouvant être impliqués dans la réaction sont représentés en vert. Le cation stabilisateur, ici un ion calcium, est représenté en rouge.

Le fait que Slt70 réalise la réaction enzymatique inverse de la réaction GT a permis d'émettre des hypothèses sur l'importance de certains résidus pouvant être impliqués dans le mécanisme catalytique des GT chez PBP1b d'*E. coli* par analogie de séquence (Terrak *et al.*, 1999). En particulier le groupement carboxylate du résidu Glu233 du premier motif conservé de la famille des GT, serait capable de donner un proton à l'atome d'oxygène de la liaison phosphoester de la chaîne glycanique donneuse (Figure 12), conduisant à la formation d'un cation oxycarbénium. Ce cation subirait ensuite une attaque nucléophile de la part du groupement hydroxyle en C4 du N-acétylméglucosamine du lipide II accepteur. Les résidus Asp234 du motif 1 et Glu290 du motif 3 pourraient être impliqués dans la stabilisation de l'intermédiaire oxycarbénium ou dans l'activation du groupement hydroxyle (Terrak *et al.*, 1999). Enfin, la présence d'un métal divalent cationique dans le site catalytique permettrait de stabiliser la charge négative de l'oxygène du groupement diphosphate partant (Schwartz *et al.*,

2002). Le rôle catalytique essentiel d'un cation divalent (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Ca^{2+}) a été observé dans la plupart des tests cinétiques sur PBP1b d'*E. coli* (Schwartz *et al.*, 2002).

III.2.1.3. Inhibition de la réaction de transglycosylation

La moénomycine est un composé naturel, extrait de *Streptomyces ghanaensis* ou *Streptomyces bambergiensis* (Huber and Neseemann, 1968). L'ajout d'une faible quantité de moénomycine à des cultures de *S. aureus* induit l'accumulation dans la cellule d'UDP-MurNAc-Lala-Dglu-Llys-Dala-Dala, précurseur soluble de la synthèse du peptidoglycane (van Heijenoort *et al.*, 1987), ce qui suggère que la moénomycine est un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire.

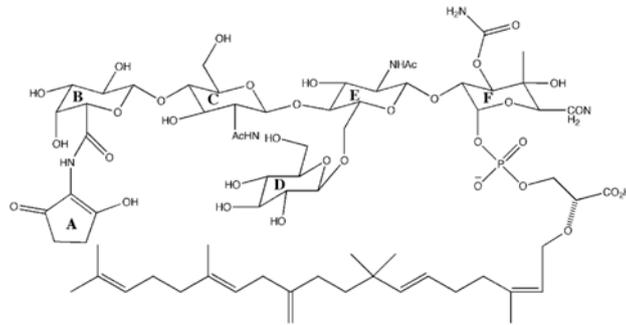
Le mode d'action de la moénomycine a été étudié plus en avant sur *E. coli* montrant que l'ajout d'antibiotique altère la morphologie, induit la lyse cellulaire et permet l'accumulation du précurseur UDP-MurNAc-pentapeptide dans le cytoplasme. D'autre part la moénomycine entraîne une décroissance de la longueur moyenne des chaînes glycanes (Kohlrausch and Holtje, 1991; van Heijenoort *et al.*, 1987).

Des tests enzymatiques et de détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) ont montré une meilleure efficacité du composé chez les bactéries Gram positives (CMI = 0,005-0,3 $\mu\text{g/mL}$) que pour *E. coli*, aucune autre bactérie Gram négative n'ayant pu être testée (CMI = 8-250 $\mu\text{g/mL}$) (Di Guilmi *et al.*, 2002). La raison de la faible inhibition d'*E. coli* par la moénomycine, serait due à la difficulté pour la molécule de franchir la membrane externe.

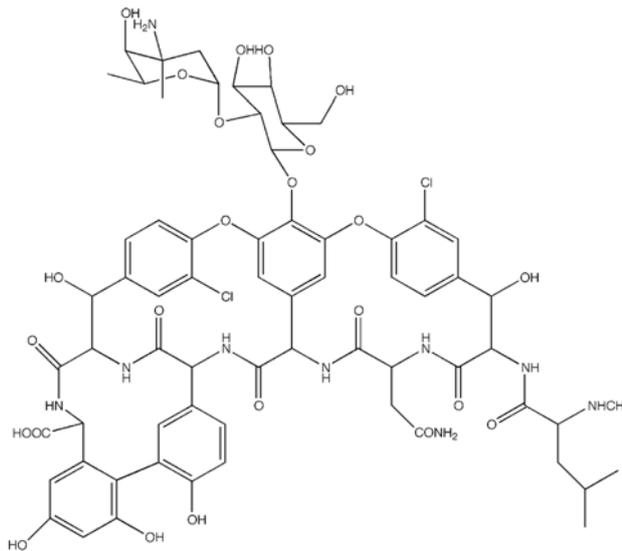
L'interaction entre la moénomycine et toutes les HMW-A PBP de *S. pneumoniae* a été démontrée à l'IBS (Di Guilmi *et al.*, 2003a; Di Guilmi *et al.*, 2003b; Di Guilmi *et al.*, 1998). Les PBP1b et 1c d'*E. coli* sont également inhibées par la moénomycine (Schiffer and Holtje, 1999; van Heijenoort *et al.*, 1987).

Des études fonctionnelles et de modélisation ont permis d'élucider une partie du mode d'action de cette molécule. Des études de relations structure/fonction ont montré que les trois cycles C, E et F (Figure 13) sont nécessaires à l'observation d'une activité antibactérienne et sont susceptibles d'interagir avec le substrat donneur (Eichelberger *et al.*, 2002). De plus, la superposition d'une chaîne de peptidoglycane avec la molécule de moénomycine met en évidence le recouvrement parfait de 4 cycles saccharidiques (Ritzeler *et al.*, 1997). Il semblerait donc que la molécule de moénomycine rentre en compétition avec la chaîne en croissance de peptidoglycane au niveau d'un site d'interaction plus large que celui

supposé pour le lipide II accepteur (Halliday *et al.*, 2006). Dans ce cas, la moénomycine serait un inhibiteur non compétitif du lipide II. En revanche, lors d'un excès de moénomycine, l'antibiotique peut avoir le même site d'interaction que le lipide II et, dans ce cas, il s'agit d'un inhibiteur compétitif (Di Guilmi *et al.*, 2003a).



Moénomycine



Vancomycine

Figure 13 : Structures chimiques de la moénomycine et de la vancomycine.

La moénomycine est largement utilisée comme facteur de croissance dans l'alimentation animale sous le nom commercial de flavomycine chez Hoechst. Son temps de demi-vie élevé n'a pas permis de l'utiliser en thérapie humaine. Cependant, les études biochimiques et la détermination des structures chimiques minimales d'inhibition ont permis de synthétiser des analogues plus performants et probablement mieux adaptés à une application clinique (Breukink and de Kruijff, 2006).

D'autres composés d'origine naturelle inhibent indirectement la réaction GT en se liant au substrat lipide II : vancomycine, teicoplanine, eremomycine (glycopeptides), mersacidine, nisine et ramoplanine (peptides) (Breukink and de Kruijff, 2006). Seuls les antibiotiques vancomycine et teicoplanine sont actuellement utilisés en antibiothérapie. Dès 1986, la première souche d'entérocoque résistant à la vancomycine est isolée en France en milieu hospitalier (Sahm *et al.*, 1989), phénomène rapidement étendu aux staphylocoques et récemment aux streptocoques. Aux Etats-Unis en 2002, on recense le premier cas de VR-MRSA (« Vancomycin-Resistant Methycillin-Resistant *S. aureus* ») et depuis, de nombreux cas ont été répertoriés dans différents pays.

La vancomycine se fixe au niveau du dipeptide terminal D-alanine-D-alanine du substrat lipide II grâce à 5 liaisons hydrogène. Dans les souches d'entérocoques résistant à la vancomycine, le peptide D-alanine-D-alanine est remplacé par D-alanine-D-lactate, diminuant ainsi le nombre de liaisons hydrogène à 4 et entraînant une diminution de l'efficacité d'acylation de 1000 fois (Arthur and Courvalin, 1993; Walsh, 1993; Walsh *et al.*, 1996).

La modification de la vancomycine au niveau du groupement disaccharide (Figure 13) permet d'inhiber directement le domaine GT en réalisant des interactions spécifiques avec PBP1b d'*E. coli* (Chen *et al.*, 2003). La découverte de deux nouveaux composés de ce type actifs contre des entérocoques résistants à la vancomycine, permet d'offrir de nouvelles perspectives pour le développement d'un nouvel antibiotique agissant directement sur les domaines GT.

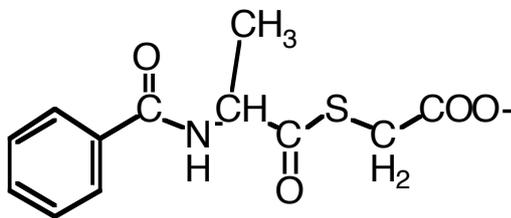
III.2.2. Mécanisme réactionnel des transpeptidases

III.2.2.1. Caractérisation de l'activité transpeptidase

La première mise en évidence de l'hydrolyse d'un substrat ressemblant fortement au pentapeptide a été rapporté pour la transpeptidase soluble R61 (Leyh-Bouille *et al.*, 1971), capable d'hydrolyser le peptide soluble (Acétyl)₂-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Cette hydrolyse est inhibée par la benzylpénicilline, qui agit comme un inhibiteur compétitif. Ces premières expériences ont permis d'avancer que la réaction de transpeptidation se faisait effectivement au niveau du site d'interaction des PBP avec la pénicilline, c'est-à-dire au sein du domaine transpeptidase. De nombreux peptides solubles ont ensuite été testés sur les transpeptidases R61 et R39 ainsi que sur les PBP de haut et faible poids moléculaire (Anderson *et al.*, 2003; Anderson and Pratt, 2000; Kumar and Pratt, 2005a; Kumar and Pratt, 2005b) avec des

résultats similaires. Ces peptides sont actifs sur les transpeptidases solubles, en revanche ils sont très peu ou pas actifs envers les PBP. Il est probable que les PBP membranaires requièrent spécifiquement un substrat membranaire particulier et /ou des partenaires protéiques présents *in vivo* (Anderson *et al.*, 2003).

Dans les années 1990, l'activité transpeptidase *in vitro* et la détermination des paramètres cinétiques est étudiée sur des substrats thioesters présentant une signature en spectrophotométrie d'absorbance UV (absorbance à 250 nm). La synthèse de différents esters et thioesters a permis d'initier une caractérisation enzymatique sur les D,D-peptidases solubles R61 de *Streptomyces* et R39 d'*Actinomadura* (Adam *et al.*, 1990; Jamin *et al.*, 1991) puis sur des PBP de haut poids moléculaire (Adam *et al.*, 1991).



**Figure 14 : substrat thioester
N-benzoyl-D-alanylmercaptoacétique (S2d)
utilisé comme substrat donneur de la transpeptidation**

En 1993, l'étude de la transpeptidation avec le substrat modèle S2d (Figure 14) est réalisée sur PBP2x de *S. pneumoniae*, à l'aide de différents acides aminés accepteurs (Jamin *et al.*, 1993). La protéine HMW-B PBP3 d'*E. coli* hydrolyse également des substrats thioesters et est capable de réaliser la transpeptidation d'un accepteur soluble L-Ala- γ -D-Glu(NH₂)-mA₂pm-D-Ala correspondant au térapeptide présent dans le peptidoglycane d'*E. coli* (Adam *et al.*, 1997).

En parallèle, plusieurs groupes se sont activement penchés sur l'extraction des substrats membranaires naturels des PBP par solubilisation des précurseurs du peptidoglycane, radiomarquage et incubation des lysats protéiques contenant les PBP1a, 1b et 3 d'*E. coli*. Les analyses en chromatographie papier montrent l'incorporation d'atomes radioactifs au sein du produit formé, ce qui tendrait à montrer que de la polymérisation s'est correctement déroulée (Ishino and Matsushashi, 1981; Ishino *et al.*, 1980; Matsushashi *et al.*, 1990; Nakagawa *et al.*, 1984; Suzuki *et al.*, 1980; Tamura *et al.*, 1980; Terrak *et al.*, 1999; van Heijenoort *et al.*, 1992). Cependant les analyses par filtration sur gel ne permettent pas de conclure sur la nature exacte des produits formés. La preuve incontestable de l'activité des PBP tant sur l'activité TP que sur l'activité GT a été rapportée en 2005 (Bertsche *et al.*, 2005) sur un dimère purifié de PBP1b d'*E. coli* en présence de lipide II purifié et radiomarqué. L'analyse directe des produits formés par HPLC a montré que 50% de peptides étaient

réticulés, avec une majorité de dimères tétra-pentapeptidiques et une faible quantité de trimères (4 à 7%) tétra-tétra-pentapeptidiques. La répartition des quantités observées correspond à celles observées *in vivo*. De plus les auteurs ont remarqué que les accepteurs pour les réactions de transpeptidation peuvent être également tri, tétra et pentapeptidiques (Bertsche *et al.*, 2005).

III.2.2.2. Mécanisme de la réaction de transpeptidation

Le mécanisme des protéases à sérine (Figure 15) implique une attaque nucléophile par la sérine active sur le carbone de la fonction carbonyle de la liaison peptidique, pour former un premier intermédiaire tétraédrique. Cet intermédiaire évolue ensuite vers un complexe acyl-enzyme avec le départ du fragment C-terminal du substrat. Le mécanisme global des acyltransférases à sérine est caractérisé par le transfert du groupement lié à l'enzyme vers un groupement accepteur. Lorsque cet accepteur est une molécule d'eau, dans le cas de la carboxypeptidation, l'hydrolyse de la liaison ester entre la sérine et le donneur est réalisée *via* un second intermédiaire tétraédrique puis le produit N-terminal est relargué, ce qui restitue l'enzyme dans son état initial. Lors de la réaction de transpeptidation, l'accepteur est un composé aminé de type $\text{NH}_2\text{-R}'$ et le groupement donneur est alors transféré sur l'accepteur, par le même mécanisme décrit plus haut, pour aboutir à un composé de transpeptidation $\text{R-CO-NH-R}'$ (Goffin and Ghuysen, 1998).

Il a été montré que lors de la transpeptidation, l'accepteur ne se fixe pas sur l'enzyme avant la fixation du substrat, mais qu'il ne s'accroche qu'après la formation de l'acyl-enzyme (Jamin *et al.*, 1991).

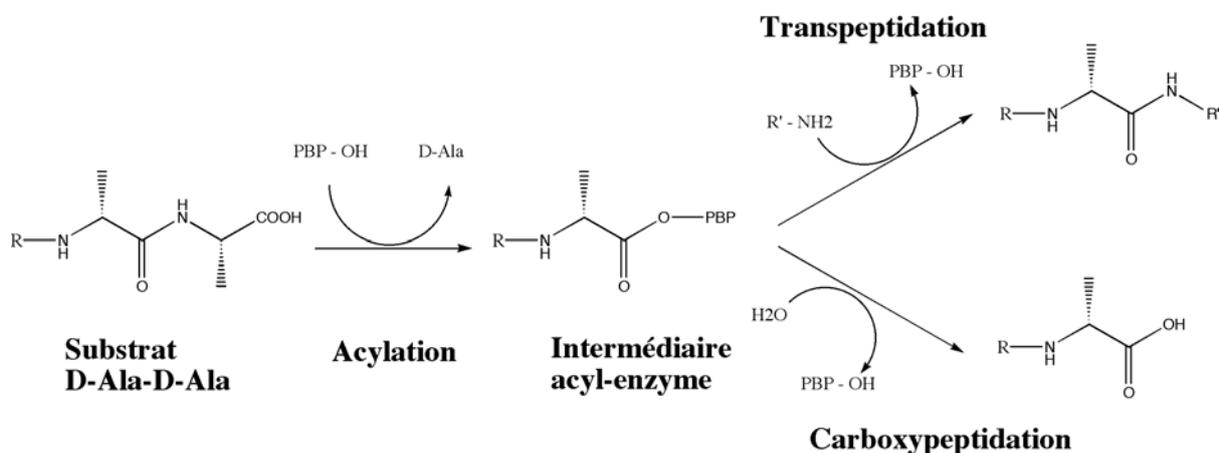


Figure 15 : Représentation schématique des réactions de carboxypeptidation et de transpeptidation.

Les différentes structures à haute résolution de transpeptidases, β -lactamases et PBP en complexe avec des antibiotiques ont permis d'avancer des hypothèses concernant les résidus impliqués dans les réactions chimiques. En particulier, des études cristallographiques ont été menées sur la transpeptidase soluble de *Streptomyces* R61, complexée avec des peptides solubles, dans différents stades d'avancement de la réaction enzymatique, montrant un intermédiaire tétraédrique (Silvaggi *et al.*, 2003), le complexe acyl-enzyme (Silvaggi *et al.*, 2004) et enfin un complexe non covalent avec les deux produits de la réaction (McDonough *et al.*, 2002).

L'activation de la sérine active se ferait tout d'abord par élimination du proton de la fonction alcool soit par la lysine du premier motif SxxK sur l'hélice alpha 2, soit par le groupement carboxylate du substrat lui-même (Gordon *et al.*, 2000; Lim and Strynadka, 2002; Nicola *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2003). La lysine du premier motif ainsi que la sérine du deuxième motif, SxN pourraient ensuite agir comme base permettant la désacylation du complexe covalent (Nicola *et al.*, 2005; Stefanova *et al.*, 2002).

III.2.2.3. Inhibition de l'activité transpeptidase

Tipper et Strominger en 1965 suggèrent que les antibiotiques de la famille des β -lactamines tels que la pénicilline et les céphalosporines miment la conformation de la portion terminale D-alanine-D-alanine du pentapeptide du peptidoglycane (Tipper and Strominger, 1965). Ils seraient capables de réagir avec la sérine active du domaine transpeptidase des PBP par addition covalente au niveau du groupement carbonyle de l'antibiotique, lequel correspond au groupement carbonyle du pénultième D-alanine de la muréine. Les antibiotiques de la famille des β -lactamines sont des antibiotiques suicides des D,D-acyltransférases (Tipper and Strominger, 1965). En effet la rupture de la liaison amide du cycle β -lactame donne lieu à une liaison ester covalente et irréversible entre la sérine active de l'enzyme et le groupement pénicilline ou céphalosporine, accompagnée de l'ouverture du noyau β -lactame (Figure 16). L'ouverture du noyau entraîne l'inactivation des antibiotiques. Le centre catalytique reste alors incapable d'accommoder un autre ligand nucléophile à cause de la gêne stérique occasionnée par la présence de l'antibiotique accroché de façon covalente et stable. En effet la désacylation de ce complexe stable est très lente et peut durer plusieurs heures (Frère *et al.*, 1975; Frère *et al.*, 1976).

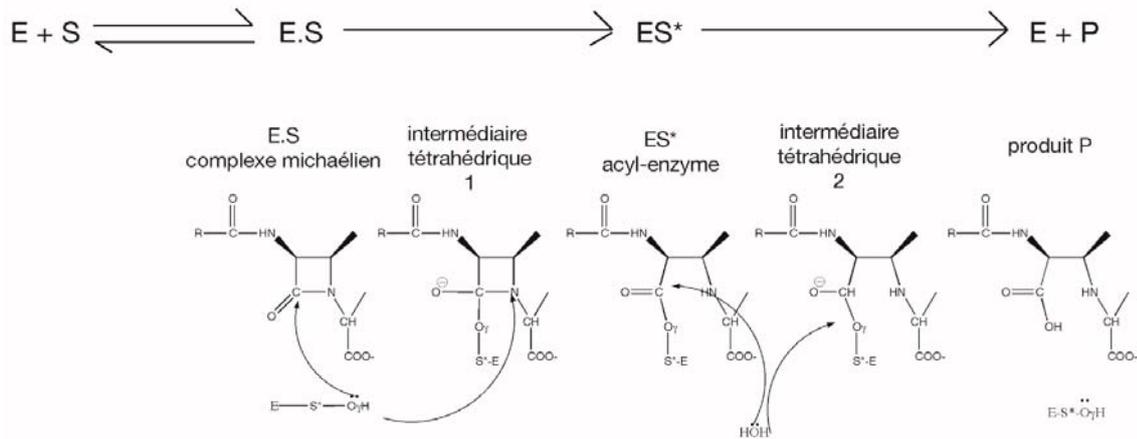


Figure 16 : Mécanisme de réaction des acyltransférases à sérine sur un antibiotique de type β -lactamine. D'après (Ghuysen, 1994).

III.3. Résistance aux antibiotiques

Il existe trois types de mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Le premier type correspond à l'inactivation de l'antibiotique par la modification de son groupement réactif présenté dans la partie III.3.1, le deuxième implique la modification de la cible spécifique à cet antibiotique par mutagenèse des résidus impliqués dans sa reconnaissance ou son accroche (chapitre III.3.3). Enfin, le troisième mécanisme de résistance dépend d'un mécanisme d'efflux d'antibiotiques vers l'extérieur de la cellule détaillé dans le chapitre III.3.2.

III.3.1. Production de β -lactamases

La résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines implique les trois mécanismes décrits plus haut, dont le plus commun reste la production d'enzymes capables de dégrader ou de modifier l'antibiotique avant d'avoir atteint sa cible. Il s'agit des β -lactamases, à la fois présentes chez les bactéries Gram positives et Gram négatives.

Le système de régulation de l'expression des β -lactamases est décrit dans la figure 17. Le domaine extracellulaire de BlaR, dont la structure tridimensionnelle est connue (Birck *et al.*, 2004; Kerff *et al.*, 2003; Wilke *et al.*, 2004) joue le rôle de senseur des β -lactamines puisqu'il est acylé par ces antibiotiques par un mécanisme d'acylation similaire aux β -lactamases et aux PBP. Il possède une sensibilité très importante aux β -lactamines, supérieure à celle décrite pour la plupart des PBP et des transpeptidases solubles (Duval *et al.*, 2003) Le

domaine transmembranaire fait ensuite office de transducteur du signal jusqu'à un domaine intracellulaire de type métalloprotéase à zinc, activé par autoprotéolyse lors de l'acylation du domaine senseur (Wilke *et al.*, 2005). Le domaine intracellulaire de BlaR est ensuite responsable du clivage de la protéine BlaI, répresseur de l'opéron bla, au niveau de son domaine de dimérisation, l'empêchant de s'associer à l'opéron et induit ainsi la production de β -lactamases.

Une fois exprimées, les β -lactamases sont sécrétées dans l'espace périplasmique (pour les bactéries Gram négatives), accrochées à la membrane ou excrétées (chez les bactéries Gram positives). Elles sont responsables de l'hydrolyse de la liaison β -lactame selon un mécanisme identique à celui des hydrolases à sérine (PBP) (Figure 16) : une base est responsable de la déprotonation de la sérine active qui est ensuite capable d'effectuer une attaque nucléophile sur l'antibiotique et former un complexe covalent. Ce complexe est ensuite désacylé de la même façon que pour les PBP, à savoir par une molécule d'eau préalablement activée par une base. La différence majeure entre les β -lactamases et les PBP réside dans le fait que la désacylation des premières est très rapide en comparaison des secondes (Guillaume *et al.*, 1997).

Les β -lactamases étaient peu présentes dans les génomes bactériens jusqu'au moment où l'usage des antibiotiques est devenu intensif, ce qui a conduit à la production de β -lactamases à large spectre d'efficacité. Elles sont subdivisées en 4 classes : les β -lactamases de classe A, C, D dérivent de la famille des PBP puisqu'elles possèdent les motifs catalytiques conservés des hydrolases à sérine et un repliement similaire (Dideberg *et al.*, 1987; Herzberg and Moulton, 1987; Lobkovsky *et al.*, 1993; Paetzel *et al.*, 2000). En effet, l'acquisition de nouvelles fonctions enzymatiques telles que la carboxypeptidation, la transpeptidation ou l'hydrolyse des β -lactamines, implique des modifications locales au niveau des séquences de gènes mais n'implique pas de changements structuraux majeurs au niveau du repliement classique central en feuillet β entouré d'hélices α de part et d'autre. La dernière classe, les β -lactamases de classe B sont des β -lactamases à zinc au repliement différent de celui des PBP (Carfi *et al.*, 1995; Garau *et al.*, 2005).

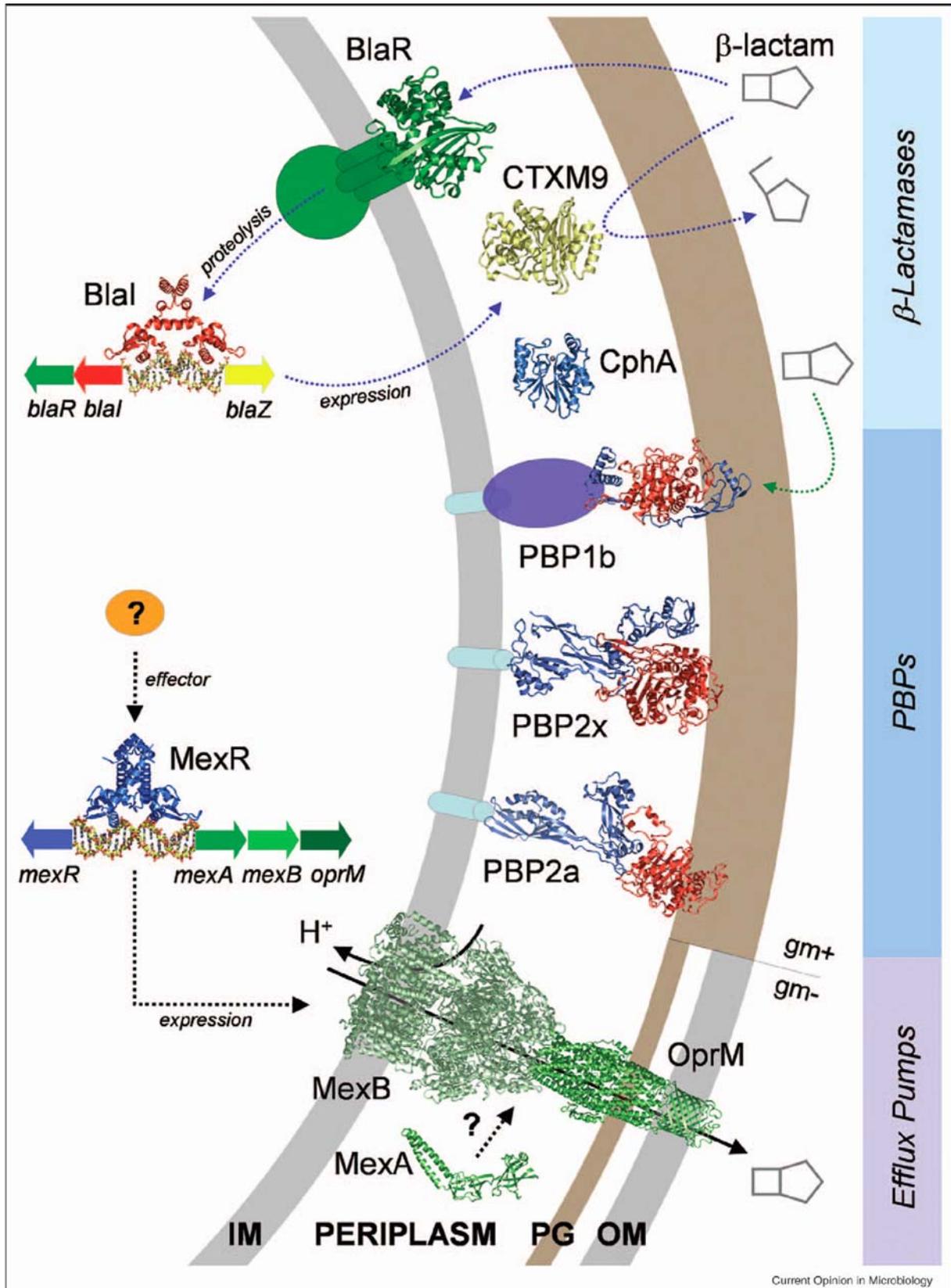


Figure 17 : Schéma des différents modes de résistance chez les bactéries d'après (Wilke *et al.*, 2005)

On peut remarquer quelques différences majeures entre les PBP et les β -lactamases, en particulier au niveau de la poche catalytique, formée d'une gorge enfouie et allongée chez les PBP, et exposée à la surface chez les β -lactamases (Gordon *et al.*, 2000; Macheboeuf *et al.*, 2006) (figure 18C et 18D). En effet les expériences *in vivo* et *in vitro* montrent qu'il existe une discrimination de substrat entre les deux familles de protéines puisque les PBP reconnaissent les chaînes peptidiques allongées du peptidoglycane tandis que les β -lactamases ne reconnaissent que les antibiotiques.

Lors de la désacylation des substrats β -lactames, les β -lactamases ont la particularité d'hydrolyser très rapidement le complexe covalent acyl-enzyme tandis que les PBP ont une vitesse de désacylation extrêmement lente. Les β -lactamases de classe A ont développé un mécanisme particulier de désacylation en incorporant un nouveau résidu au niveau d'un motif conservé ExxxN situé sur la boucle Ω , au bas de la cavité enzymatique (Figure 18). Le glutamate E166 fait office de base capable d'activer une molécule d'eau, ainsi prête pour attaquer le complexe acyl-enzyme (Adachi *et al.*, 1991; Guillaume *et al.*, 1997). La place du glutamate E166 chez TEM1, une β -lactamase de classe A (Figure 18B) est remplacé par une glycine chez la plupart des PBP : G161 chez PBP3 de *S. pneumoniae*, G451 chez PBP2x, G152 chez PBP5 d'*E. coli*, G144 pour la transpeptidase K15 de *Streptomyces* et G520 pour PBP2a de *S. aureus*. La glycine dans le cas des PBP, permet d'éviter les encombrements stériques lorsque le substrat peptidique entre dans la cavité enzymatique, alors que le glutamate 166 de TEM1 est responsable de l'accélération de la vitesse de désacylation du substrat chez les β -lactamases. Ainsi l'évolution de la glycine des transpeptidases et carboxypeptidases en glutamate évite aux β -lactamases de classe A d'agir en tant que carboxypeptidases et leur permet d'avoir une vitesse d'hydrolyse des antibiotiques largement plus rapide que pour les PBP (Guillaume *et al.*, 1997).

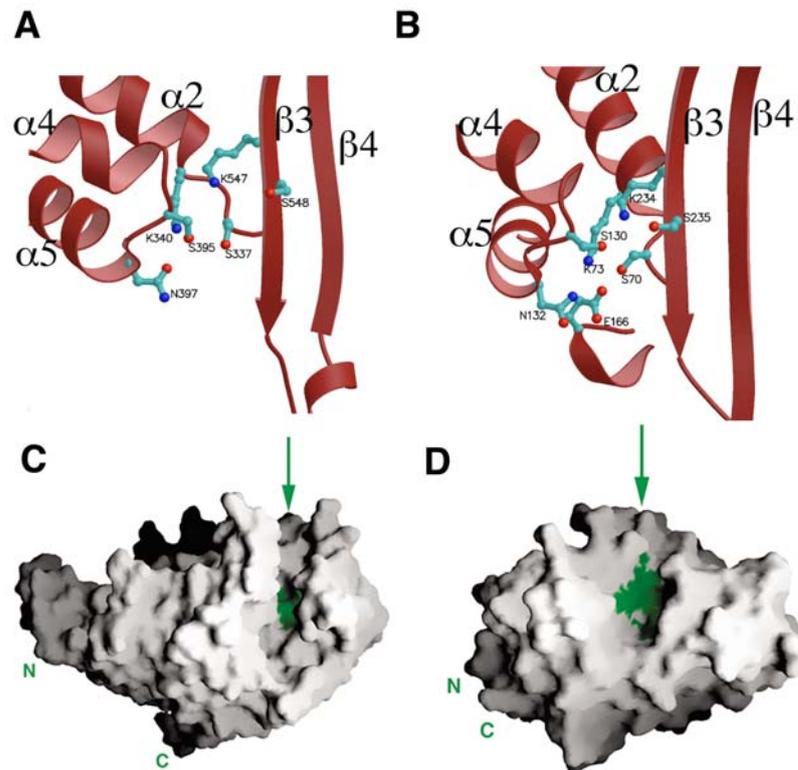


Figure 18 : Représentation des sites actifs de PBP2x et TEM1 (Macheboeuf *et al.*, 2006)

Malgré la conservation des motifs de la famille des hydrolases à sérine pour PBP2x (A) et la β -lactamase de classe A TEM1 (B), la représentation en surface de PBP2x (C) montre une gorge catalytique allongée pour laquelle le site actif est représenté en vert. Au contraire, le site catalytique de la β -lactamase TEM1 (toujours en vert, D) se trouve en surface de la molécule. Le glutamate 166 responsable de la désacylation chez les β -lactamases de classe A est représenté.

Enfin, toutes les structures à haute résolution et les structures d'états intermédiaires des β -lactamases (Chen *et al.*, 2005) nous permettent d'avoir une vue globale du mécanisme catalytique en terme d'attraction de protons, d'attaque nucléophile et devraient permettre de dessiner des nouvelles molécules susceptibles de perturber le chemin réactionnel des transférases à sérine.

III.3.2. Les pompes à efflux

Les bactéries Gram négatives possèdent un système supplémentaire pour résister aux attaques des antibiotiques, à savoir les pompes à efflux. Le système requiert la translocation des molécules d'antibiotiques ou chimiques à la fois à travers la membrane interne, l'espace périplasmique et la membrane externe, ce qui implique un système de pompe en trois parties.

La figure 17 est une représentation schématique du système d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* (Wilke *et al.*, 2005) contenant les protéines MexB au niveau de la membrane interne, MexA au niveau de l'espace périplasmique et OprM localisée sur la membrane externe de la bactérie. Cette représentation a été réalisée à partir des structures de MexA (Higgins *et al.*, 2004) et d'homologues de OprM et MexB, soit respectivement TolC (Koronakis *et al.*, 2000) et AcrB (Murakami *et al.*, 2002) d'*E. coli*. La modélisation du complexe présenté en figure 17, possède une taille de 870 kDa, et 270 Å de longueur (Eswaran *et al.*, 2004). Le substrat entrerait dans la protéine présente en surface de la membrane interne et serait conduit grâce à un flux de protons, à travers la membrane jusqu'à l'espace périplasmique, où il serait pris en charge par la protéine à la surface de la membrane externe. L'étanchéité entre les deux transporteurs serait rendu possible par l'intermédiaire de la petite protéine MexA. A partir des structures tridimensionnelles des acteurs de la pompe à efflux, il devient possible d'imaginer la conception de nouvelles molécules inhibitrices, au niveau de l'accroche des antibiotiques sur le transporteur intra membranaire, ou au niveau de l'entrée de la cavité du transporteur de la membrane externe.

III.3.3. Modification de la cible des β -lactamines : les PBP.

III.3.3.1. Les PBP modifiées du pneumocoque

Le pneumocoque ne possède ni pompe à efflux, ni β -lactamase pour lutter contre les attaques des antibiotiques, en revanche il a développé un système de modification des cibles préférentielles des antibiotiques de la famille des β -lactamines, à savoir les PBP.

En effet, le pneumocoque possède un système naturel de transformation lui permettant d'échanger du matériel génétique avec d'autres espèces de streptocoques. Cette propriété est importante pour l'évolution naturelle de la bactérie, lui permettant de s'adapter rapidement à des changements d'environnement (Hakenbeck *et al.*, 1999)

Les souches de pneumocoques résistantes aux β -lactamines, isolées cliniquement sont le fruit de transformations génétiques permettant l'acquisition de formes altérées de PBP de classe A et de classe B, donnant lieu à un remplacement de blocs de séquences divergeant d'environ 20% en séquence et environ 10% en acides aminés (Dowson *et al.*, 1989; Laible *et al.*, 1991; McDougal *et al.*, 1995). L'insertion de ces blocs de séquences homologues crée des gènes de PBP modifiés, appelés gènes mosaïques. Les comparaisons de séquences de gènes

de PBP de *S. pneumoniae* avec ceux d'autres streptocoques de la flore naso-pharyngée, principalement *S. mitis* et *S. oralis*, révèlent des transferts horizontaux de gènes (Hakenbeck *et al.*, 1998; Sibold *et al.*, 1994).

Les cibles principales de ces événements de recombinaison chez le pneumocoque implique PBP1a, 2b et PBP2x. Lors de l'acquisition par le pneumocoque des premiers niveaux de résistance aux céphalosporines, PBP2x est la première cible touchée par les événements de recombinaison. Ensuite, la résistance est significativement augmentée par la modification de PBP1a (Coffey *et al.*, 1995; Smith and Klugman, 2003). PBP2b ne semble pas être impliqué dans ce type de résistance puisqu'il possède seulement une très faible affinité pour les céphalosporines (Hakenbeck *et al.*, 1987). En revanche, les trois protéines, PBP2x, PBP2b et PBP1a, sont impliquées dans la résistance aux pénicillines (Hakenbeck *et al.*, 1994; Smith and Klugman, 1998).

Les nombreuses études biochimiques et structurales sur PBP2x issu de souches mutantes cliniques ou de laboratoire ont permis d'élaborer deux mécanismes principaux de résistance aux β -lactamines. Le premier mécanisme a pu être mis en évidence grâce à l'analyse structurale et biochimique d'un mutant de PBP2x issu d'une souche clinique hautement résistante, la souche Sp328 dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la pénicilline est de 4 $\mu\text{g/ml}$ (CMI environ 100 fois supérieure à la CMI d'une souche sensible). L'analyse de la séquence Sp328 comporte 92 mutations, en particulier dans l'environnement du second motif catalytique SxN. Des mutations dans la région du site catalytique induisent des conflits stériques, provoquant sa désorganisation partielle. (Dessen *et al.*, 2001; Mouz *et al.*, 1998). Comme illustré dans la figure 19, la mutation N514H entraîne la flexibilité de l'hélice $\alpha 4$. En conséquence, la sérine 395 du deuxième motif catalytique situé sur la boucle reliant $\alpha 4$ et $\alpha 5$ n'a plus la possibilité d'établir de liaisons hydrogène stabilisatrices de la triade catalytique. Elle est aussi responsable de la perte d'un tiers des liaisons hydrogène de la cavité enzymatique (Dessen *et al.*, 2001)

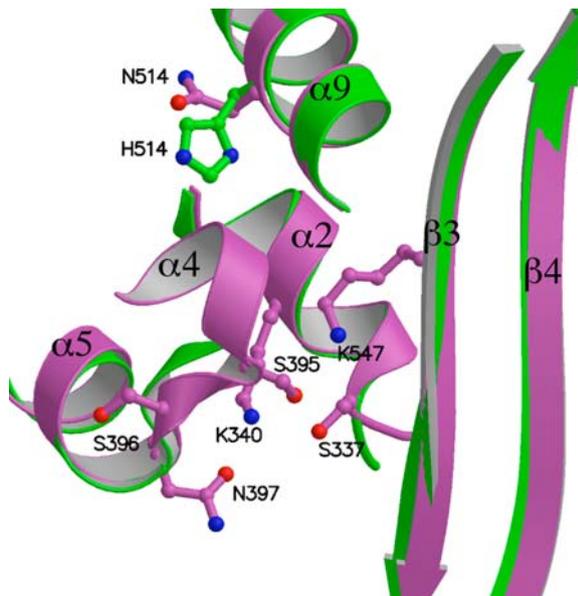


Figure 19 : Sites actifs superposés de PBP2x d'une souche sensible (violet) et de la souche Sp328 (vert). La mutation N514H entraîne une flexibilité de l'hélice $\alpha 4$ qui n'est plus visible dans la structure de Sp328. (Macheboeuf *et al.*, 2006).

De plus, l'instabilité de cette région permettrait l'ouverture du site actif et l'entrée d'un substrat « branché », abondant dans les souches de pneumocoques résistants, dans la gorge catalytique (Garcia-Bustos and Tomasz, 1990; Severin *et al.*, 1996). Des études récentes sur une autre souche hautement résistante la souche 5204 (CMI à la pénicilline = 6 $\mu\text{g/ml}$) montre que la boucle reliant les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ est sensible à la digestion protéolytique, impliquant qu'elle serait mobile et non structurée (Carapito *et al.*, 2005). Ce résultat renforce l'hypothèse que cette boucle serait un des acteurs majeurs de la résistance

Un deuxième mécanisme de résistance de PBP2x a été mis en évidence grâce à l'étude d'une souche de sensibilité intermédiaire (souche 5259 dont la CMI pour la pénicilline est de 0.19 $\mu\text{g/ml}$). La mutation Q552E en bas du brin $\beta 3$ implique l'apparition d'une charge négative ou du moins d'un groupement acide à l'entrée de la gorge catalytique pouvant gêner l'approche d'antibiotiques chargés négativement (Figure 20) (Pernot *et al.*, 2004).

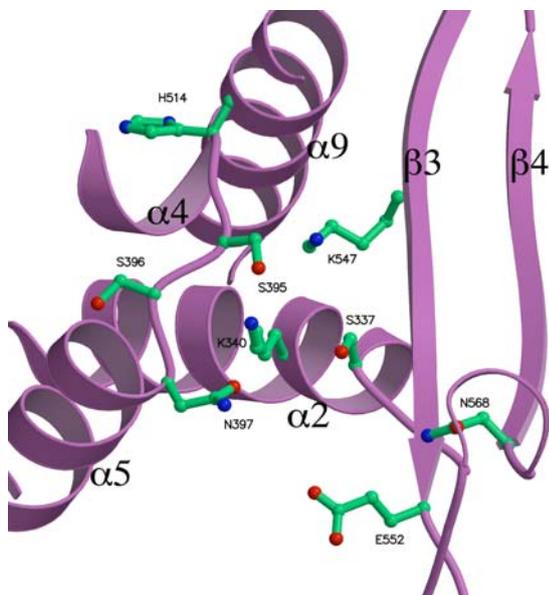


Figure 20 : Site actif de PBP2x de la mutation Q552E est visible en bas de la cavité enzymatique et réduit l'affinité du substrat pour la gorge catalytique.

Des études cinétiques sur PBP2x issue d'une souche sensible aux antibiotiques et à laquelle on a rajouté la mutation Q552E induit une baisse d'acylation d'un facteur 4 pour la céfotaxime et d'un facteur 5,6 pour la pénicilline (Pernot *et al.*, 2004).

Enfin, l'étude structurale d'un mutant de laboratoire possédant les mutations T338A et M339F montre une distorsion importante au niveau de l'hélice α_2 , probablement responsable de la baisse significative de l'efficacité d'acylation des antibiotiques (Chesnel *et al.*, 2003).

Ainsi l'introduction de mutations pouvant déstabiliser le site actif de la protéine ou modifier sa charge électrostatique permet au pneumocoque de réduire la reconnaissance ou la stabilisation des antibiotiques au niveau du site actif, tout en continuant d'agir pour la synthèse de peptidoglycane.

III.3.3.2. Résistance à la méthicilline chez *S. aureus*

S. aureus est un agent pathogène responsable de la plupart des infections nosocomiales acquises à l'hôpital. Des souches résistantes à la méthicilline (MRSA pour « Methicillin Resistant *S. aureus* ») sont apparues en 1961, un an seulement après la commercialisation de la méthicilline, et sont actuellement répandues dans le monde entier (Chambers, 2001). *S. aureus* utilise un mécanisme de résistance différent de celui du pneumocoque, puisque au lieu d'acquérir des blocs de gènes mosaïques induisant des PBP de faible affinité pour les antibiotiques, la bactérie produit une nouvelle PBP de classe B : PBP2a ou PBP2'. PBP2a est une PBP de classe B de type 4 (Figure 8), codée par le gène *mecA* transféré de façon horizontale à partir d'un donneur inconnu (Enright *et al.*, 2002; Pinho *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2001) et possède une affinité aux antibiotiques intrinsèquement diminuée. Lorsque les quatre PBP de *S. aureus* sont inhibées, PBP2a est alors capable d'assumer leurs fonctions, conférant ainsi une résistance à large spectre (Pinho *et al.*, 2001).

La synthèse de PBP2a est induite par le système SCCmec comprenant le senseur membranaire MecR1 et le répresseur de transcription MecI. De façon similaire à l'activation de la synthèse des β -lactamases, les antibiotiques de type β -lactamine entrent en contact avec la partie senseur extracellulaire de MecR1, induisant un changement conformationnel de la protéine, puis la protéolyse de son domaine cytoplasmique. Cette cascade de réactions se termine par l'interaction de MecR1 avec le répresseur MecI et ainsi la dérégulation du gène *mecA*, induisant la production de PBP2a (Garcia-Castellanos *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001). La protéine PBP2a possède une activité TP qui n'est révélée que lorsque les autres PBP du génome sont inactivées (Pinho *et al.*, 2001).

La structure cristallographique de PBP2a sous la forme apoenzyme et complexée avec des antibiotiques (Lim and Strynadka, 2002) a permis de mettre en évidence le mécanisme de résistance chez cette bactérie. Il semble que la résistance soit due à la déformation du site actif, nécessitant la rotation du domaine α/β pour permettre d'accommoder le substrat (Figure 21).

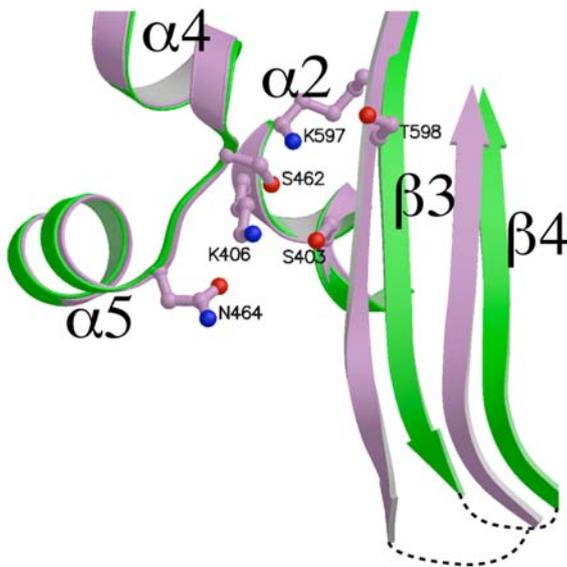


Figure 21 : Sites actifs de PBP2a sous forme apoenzyme (en violet) et sous forme complexée avec un antibiotique (en vert).
L'ouverture du site actif requiert une distorsion du feuillet β et un mouvement du domaine gauche (α/β).

La conformation fermée de l'apoenzyme (en violet sur la Figure 21) serait l'étape clef du mécanisme de résistance au moment de la transition entre le complexe michaélien non covalent et le complexe covalent acyl-enzyme, qui est l'étape limitante de la réaction puisque coûteuse énergétiquement (Lim and Strynadka, 2002). Dans ce cas, l'accroche de l'antibiotique engendrerait un changement conformationnel de rotation de l'enzyme, particulièrement défavorable. Il a été montré récemment que des souches à plus haut niveau de résistance présentaient des mutations ponctuelles dans la séquence de PBP2a (Katayama *et al.*, 2004).

III.3.3.3. Résistance chez *Enterococcus faecium*

Les entérocoques sont 10 à 1000 fois moins sensibles à la pénicilline que les streptocoques en raison de la production d'une PBP de classe B de type 4 (Figure 8) de faible affinité pour les antibiotiques, PBP5fm (Murray, 1990). De la même façon que pour PBP2a de *S. aureus*, PBP5fm n'active sa fonction de transpeptidation que lorsque toutes les autres PBP ont été inactivées, prenant ensuite en charge le mécanisme de réticulation du

peptidoglycane. L'acquisition d'un faible niveau de résistance est dû à la surproduction de PBP5fm (Rybkin *et al.*, 1998), alors que les plus hauts degrés de résistance sont induits par des mutations ponctuelles au sein de la cavité enzymatique, pouvant aboutir à des niveaux de résistance correspondant à une CMI de 512 µg/ml (al-Obeid *et al.*, 1990; Fontana *et al.*, 1994; Murray, 1990; Zorzi *et al.*, 1996).

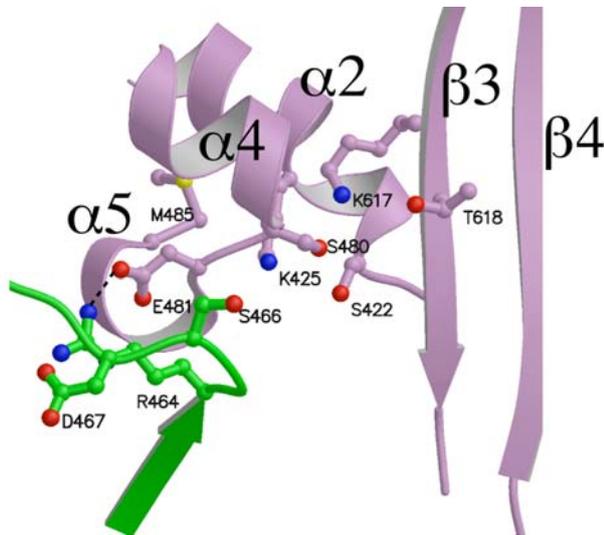


Figure 22 : Site actif de PBP5fm.

La méthionine M485 au bout de l'hélice $\alpha 5$ stabilise la lysine catalytique K425. La mutation de cette méthionine en alanine ou en thréonine déstabilise la lysine et confère un phénomène de résistance aux antibiotiques. La boucle verte est responsable de la reconnaissance du substrat et peut accommoder un résidu supplémentaire pour augmenter son degré de résistance.

La structure cristallographique de PBP5fm montre que celle-ci présente une topologie classique de transpeptidase, précédée par une région N-terminale allongée (Sauvage *et al.*, 2002).

Une des mutations principales référencées dans les mutants de PBP5fm est celle du résidu M485 situé sur l'hélice $\alpha 5$, trois résidus après le deuxième motif catalytique (Figure 22). La mutation de cette méthionine en thréonine ou en alanine est responsable de l'augmentation de la CMI de 16 fois en comparaison de la forme sauvage. Une explication de ce phénomène pourrait venir du fait que dans la forme sauvage, la méthionine stabiliserait la lysine catalytique K425, alors qu'un mutant comportant une chaîne latérale moins large, ne pourrait plus stabiliser cette lysine et ainsi lui permettrait d'acquérir plus de degré de liberté, mais avec une efficacité d'acylation moindre (Rybkin *et al.*, 1998; Sauvage *et al.*, 2002).

Certaines souches d'entérocoques résistants possèdent une sérine supplémentaire (Ser 466') entre les résidus 466 et 467 (Zorzi *et al.*, 1996). Dans la figure 22, la partie gauche de la cavité est stabilisée par un pont salin entre les résidus Arg-464 et Glu-481 et le résidu Val-465 lui-même impliquée dans la reconnaissance du substrat. L'insertion d'un résidu dans cette boucle pourrait affecter à la fois la stabilisation de la boucle et la reconnaissance de l'antibiotique (Rybkin *et al.*, 1998; Sauvage *et al.*, 2002).

III.4. Implication des PBP *in vivo*

Chez *S. pneumoniae*, on recense 6 PBP dont 3 HMW-A PBP et 2 HMW-B PBP. *E. coli* en possède 11, *Bacillus subtilis*, 2 et *S. aureus*, 5 (Tableau 1). Pour établir le rôle physiologique de chacune de ces PBP, de nombreux groupes ont créé des souches mutantes dans lesquelles une ou plusieurs PBP étai(en) supprimée(s).

L'importance des HMW-B PBP a été établie chez *E. coli*, qui possède 2 PBP de classes B, PBP2 et PBP3. L'inactivation de PBP2 inhibe l'élongation des cellules qui apparaissent sous forme de larges sphères (Ogura *et al.*, 1989; Spratt, 1975) et celle de PBP3 affaiblit la formation du septum entraînant les bactéries à croître en structures filamenteuses (Spratt, 1975). En revanche, l'inactivation simultanée de PBP2 et PBP3 conduit à la lyse cellulaire (Denome *et al.*, 1999; Gutmann *et al.*, 1986; Schmidt *et al.*, 1981) laissant penser que *E. coli* nécessite au moins une PBP de classe B pour la formation d'un peptidoglycane viable. Chez *S. pneumoniae*, la délétion individuelle d'une des PBP de classe B est létale (Kell *et al.*, 1993), impliquant que PBP2x et PBP2b ne peuvent pas se substituer l'une à l'autre (Krauss *et al.*, 1996).

	<i>E. coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Classification de Gram	-	+	+	+
PBP de classe A	PBP1a (division) PBP1b (élongation) PBP1c	PBP1a (division) PBP2a (élongation) PBP1b	PBP1 (division) PBP2c (sporulation) PBP4 PBP2d (sporulation)	PBP2 (division)
PBP de classe B	PBP2 (élongation) PBP3 (division)	PBP2b (élongation) PBP2x (division)	PBP2a (élongation) PBP2b (division) PBP3 VD (sporulation) PbpH (élongation) PBP4b	PBP2a PBP1 PBP3
LMW PBP CP	PBP5 PBP6 PBP6b	PBP3	PBP5 PBP5* PBP4a DacF	

Tableau 1 : Classification des différentes PBP chez *E. coli*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis* et *S. aureus* (d'après, (Scheffers and Pinho, 2005). Les différentes localisations ou fonctions associées sont indiquées entre parenthèses. Seules les PBP de classe A, B et les CP sont présentées dans ce tableau.

L'importance des PBP bifonctionnelles a également été investiguée. Chez *E. coli*, la délétion individuelle de PBP1a et PBP1b est tolérée, mais la délétion simultanée des deux est

létale (Kato *et al.*, 1985). Ces 2 PBP de classe A seraient donc indispensables pour l'initiation ou la continuation de l'élongation et la réticulation du peptidoglycane et la troisième PBP de classe A, PBP1c, ne peut compléter leur délétion (Kato *et al.*, 1985). Ces expériences posent la question du rôle physiologique de PBP1c. L'importance de PBP1a par rapport à PBP1b a été investiguée plus avant par l'étude de combinaisons de mutants chez *E. coli* (Denome *et al.*, 1999). Ces études montrent que lorsque PBP2 et PBP3 sont inactivées, la délétion de PBP1a entraîne un élargissement de la morphologie de la bactérie tandis que celle de PBP1b est létale. Ainsi PBP1b et soit PBP2, soit PBP3 sont essentielles à la survie de la bactérie et capables de synthétiser à elles seules un peptidoglycane fonctionnel (Denome *et al.*, 1999).

Chez *B. subtilis*, les trois PBP bifonctionnelles PBP1, PBP2c et PBP4 peuvent se substituer les unes aux autres, et la perte des 3 simultanément n'est pas fatale (Popham and Setlow, 1996). La perte de PBP1 entraîne une diminution de la vitesse de croissance et des anomalies morphologiques. La perte supplémentaire de PBP4 accentue ces anomalies morphologiques au contraire de celle de PBP2c. Le fait que la substitution de toutes les PBP de classe A n'influe pas sur la fabrication du peptidoglycane et qu'aucune MGT n'ait été recensée dans le génome de *B. subtilis* permet d'envisager l'existence de protéines non référencées impliquées dans la polymérisation des chaînes glycanes.

Pour le pneumocoque, la délétion individuelle des gènes codant pour les 3 PBP de classe A PBP1a, PBP1b et PBP2a peut être effectuée sans modification apparente de la croissance et de la division bactérienne. Ceci démontre qu'aucune PBP de classe A considérée individuellement n'est indispensable, c'est-à-dire que l'une ou les deux PBP restantes peuvent compenser l'absence de la troisième. En revanche les double délétions des gènes *pbp1b-pbp1a* et *pbp1b-pbp2a* entraînent une croissance plus lente, des anomalies au niveau du positionnement des septa et une lyse accélérée en comparaison de la souche sauvage (Paik *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que les délétions simultanées des gènes *pbp1a* et *pbp2a* n'ont jamais pu être réalisées, ce qui conduit à penser que ces deux délétions simultanées sont létales chez le pneumocoque (Paik *et al.*, 1999).

Différents groupes ont réalisé des insertions de séquences de gènes inertes à l'intérieur du domaine GT des 3 PBP de classe A empêchant l'expression des protéines (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999). L'inactivation du domaine GT ainsi provoquée affecte également la fonction de transpeptidation des PBP, ce qui ne permet pas de conclure quant au rôle précis des domaines GT et TP spécifiques aux PBPs de classe A (Hoskins *et al.*, 1999).

Enfin, des mutants de PBP2a traités à la moénomycine montrent des modifications morphologiques majeures impliquant que PBP2a serait d'une part la première cible des inhibiteurs de type moénomycine (Paik *et al.*, 1999) et un des acteurs principaux de la transglycosylation chez le pneumocoque (Hoskins *et al.*, 1999).

III.5. Rôle des PBP dans les étapes de division cellulaire

Durant les étapes de la division cellulaire, du peptidoglycane doit être synthétisé à la fois au niveau du site de division (le septum) et en périphérie pour permettre l'élongation de la bactérie (Figure 23). Les processus de division et d'élongation impliquent que de nombreuses protéines en plus des PBP, colocalisent au niveau des différents sites du processus. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycane et la division cellulaire sont rassemblés au sein d'un groupe de gènes nommé *dcw* (Division and cell wall cluster) (Ayala *et al.*, 1994; Vicente and Errington, 1996).

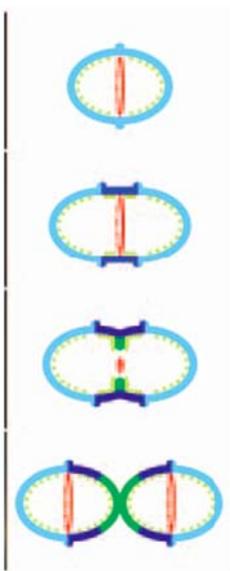


Figure 23 ; Représentation schématique de la division du pneumocoque. L'anneau FtsZ se localise au septum en formant un anneau rouge. La formation du peptidoglycane au niveau du site d'élongation est représentée en bleu foncé et celle réalisée au niveau du site de division en vert. (Morlot *et al.*, 2004)

La division cellulaire est initiée au niveau du septum, par la polymérisation GTP-dépendante dans le cytoplasme de la protéine FtsZ, équivalent bactérien de la tubuline, sous la forme d'un anneau de constriction (Figure 23) (Bi and Lutkenhaus, 1991; Errington *et al.*, 2003). Chez les bactéries en forme de bâtonnet telles que *E. coli*, l'absence de FtsZ conduit à des cellules en élongation perpétuelle formant de longs filaments (Bi and Lutkenhaus, 1992) ; chez les coques tels que *S. aureus*, la délétion de FtsZ conduit à la délocalisation de la synthèse du peptidoglycane sur toute la surface de la bactérie (Pinho and Errington, 2003).

Lorsque l'anneau de FtsZ est formé, les protéines impliquées dans les processus de division viennent se positionner au niveau du septum de façon spécifique et interdépendante (Figure 24). Chez *E. coli*, FtsA et ZipA se fixent en premier et seraient responsables de la stabilisation de l'anneau de FtsZ (Den Blaauwen *et al.*, 1999; Gueiros-Filho and Losick, 2002; Pichoff and Lutkenhaus, 2002). Par la suite, les protéines FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI (PBP3), FtsN puis AmiC s'ajoutent successivement au complexe (Errington *et al.*, 2003). Les protéines FtsL et FtsB colocalisent de façon interdépendante et le complexe binaire n'est associé au complexe de la division qu'en présence de FtsQ (Buddelmeijer and Beckwith, 2004; Noirclerc-Savoie *et al.*, 2005). Dans l'étude du phénomène de la division cellulaire, le système bactérien le plus étudié est celui d'*E. coli*, pour lequel il existe un découplage dans le temps entre la polymérisation de FtsZ et la constriction du septum à proprement parlé ; il est imaginable que ce temps soit être mis à profit par les protéines partenaires pour venir se localiser au niveau de l'anneau (Aarsman *et al.*, 2005; Den Blaauwen *et al.*, 1999).

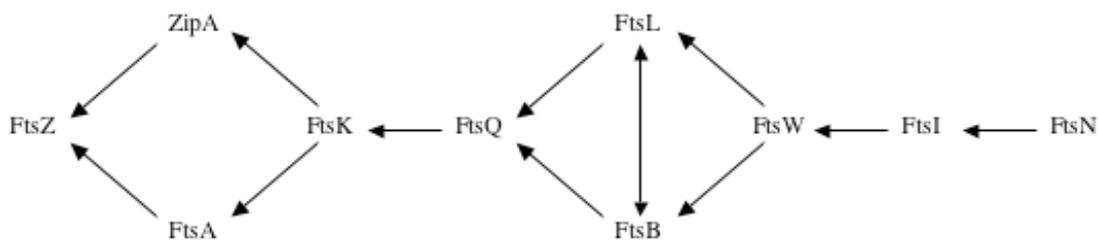


Figure 24 : Ordre de recrutement au septum des protéines impliquées dans les étapes de division cellulaire chez *E. coli*. Une flèche entre deux protéines indique que l'une est nécessaire à la localisation de l'autre (indiquée par la pointe de la flèche).

Des expériences biochimiques, d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence sur *E. coli*, *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *S. aureus* et *S. pneumoniae* ont montré que pour chacun des processus d'élongation et de division, il fallait au moins une PBP de classe A couplée avec une seule PBP de classe B, éventuellement en association avec des GT lytiques (Figue *et al.*, 2004; Morlot *et al.*, 2003; Popham and Young, 2003; Romeis and Holtje, 1994; Vollmer *et al.*, 1999) (Tableau 1).

Chez *E. coli*, des expériences de mutations sélectives et de localisation ont permis de définir un rôle précis pour chacune des deux PBP de classe B, PBP2 et PBP3. L'inactivation de PBP2 confère une morphologie sphérique aux cellules mutantes, et sa localisation sur toute la partie cylindrique de la bactérie montre que PBP2 est impliquée dans les processus

d'élongation (de Pedro *et al.*, 2001; Den Blaauwen *et al.*, 2003). En revanche les bactéries mutantes privées de PBP3 montrent un phénotype filamenteux (Botta and Park, 1981; Spratt, 1975) et sa localisation spécifique au septum (Wang *et al.*, 1998) en fait un acteur principal du mécanisme de division. La localisation de PBP3 dépend essentiellement de son hélice transmembranaire (Wissel *et al.*, 2005).

La participation des PBP de classe A de *S. pneumoniae* aux différentes étapes du cycle cellulaire a été démontrée par des expériences de colocalisation avec la protéine FtsZ (Morlot *et al.*, 2003). Les résultats d'immunofluorescence ont montré une colocalisation de PBP1a avec FtsZ au niveau du septum, suggérant une implication dans l'étape de septation. Les expériences précédemment décrites de délétion systématique de gènes ont permis de montrer que la présence de PBP1a et PBP2a étaient essentielles à la survie du pneumocoque (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999), laissant penser que PBP2a est impliquée dans le mécanisme d'élongation. Toutefois la localisation de PBP1b à la fois au niveau des sites de division et d'élongation, ne permet pas d'attribuer une fonction claire à cette protéine (Morlot *et al.*, 2003). Elle pourrait se substituer à l'une ou l'autre des PBPs de classe A, mais pas aux deux en même temps.

De nombreuses études ont permis de localiser la plupart des PBP de façon individuelle pour *E. coli*, *S. pneumoniae*, *B. subtilis* et *S. aureus*, résultats rassemblés dans le tableau 1. De façon générale, le complexe de la division cellulaire semble impliquer de nombreuses protéines pour former un complexe multienzymatique (Bramhill, 1997; Romeis and Holtje, 1994; Vollmer *et al.*, 1999), auquel les PBP pourraient être associées.

Contexte et objectif des travaux

L'objectif de la thèse consistait en la caractérisation structurale d'une PBP bifonctionnelle. Parmi les trois PBP de classe A de *S. pneumoniae*, organisme modèle étudié à l'IBS, PBP1b a été choisie en raison de la solubilité de sa partie périplasmique (Di Guilmi *et al.*, 1998; Di Guilmi *et al.*, 1999). Elle constituait ainsi le meilleur espoir de déterminer pour la première fois la structure d'une PBP bifonctionnelle, et en particulier d'un domaine glycosyltransférase (GT).

Ce que l'on sait sur PBP1b

PBP1b, contrairement aux cinq autres PBP du pneumocoque, possède la particularité de ne pas avoir son gène localisée dans la région *dcw* impliquée dans la division cellulaire. La région du chromosome de *S. pneumoniae* contenant *pbp1b* comporte des gènes codant pour une ATPase transporteuse de cations *atkA*, une tyrosyl-tRNA synthétase *syyl*, ainsi que le gène *ydeD* de fonction inconnue ; aucun de ces gènes n'est impliqué, *a priori*, dans la division cellulaire. La nature et la localisation du promoteur de transcription ne sont pas connues (Hoskins *et al.*, 1999).

La fonction précise de PBP1b dans la bactérie n'a pas été clairement identifiée puisque les expériences d'immunofluorescence sur les PBP du pneumocoque ne donnent pas de localisation tranchée entre le septum et le site d'élongation du peptidoglycane (Morlot *et al.*, 2003). Nous savons en revanche que PBP1b interagit avec le lipide II, probablement lorsque celui-ci est sous forme de micelles, grâce à des expériences de gels natifs en présence de lipide II dansylé (Di Guilmi *et al.*, 2003). De plus, l'étude de différentes constructions de PBP1b a montré que cette interaction se faisait au niveau du deuxième motif (G₁₇₆XSTxTQQ) du domaine GT, mais pas du premier (E₁₄₅DxxFxxHxG). On pourrait imaginer toutefois que le premier motif soit impliqué dans la catalyse (Di Guilmi *et al.*, 2003).

Objectif du travail

Le premier objectif de ce travail de thèse a consisté à résoudre la structure du domaine transpeptidase de PBP1b de *S. pneumoniae*. Les premières tentatives de cristallisation de la forme périplasmique entière, contenant les domaines GT et TP avaient été initiées en 1999 au laboratoire, mais sans succès. Nous avons initié une nouvelle approche consistant en l'étude séparée des domaines catalytiques de cette protéine.

A plus long terme, ce travail s'inscrivait dans une thématique de découverte de nouvelles molécules-médicaments. En effet, la menace grandissante de la résistance du pneumocoque à la plupart des antibiotiques utilisés en antibiothérapie pose le problème de

développement constant de nouvelles molécules inhibitrices. Dans ce cadre, et malgré le fait que PBP1b ne soit pas impliquée dans les processus de développement de la résistance (Du Plessis *et al.*, 2000), une structure de domaine transpeptidase de PBP de classe A nous permettrait d'étendre nos connaissances concernant les interactions du site actif avec des molécules inhibitrices. Ces informations sont cruciales dans le processus de synthèse de nouveaux ligands susceptibles d'agir comme de nouveaux antibiotiques.

Le deuxième objectif concernait l'étude structurale du domaine glycosyltransférase de PBP1b. Aucune donnée structurale n'était disponible concernant un domaine GT de PBP ou même d'une GTase monofonctionnelle, ce qui laissait augurer de la difficulté du travail. En effet, les nombreuses tentatives infructueuses de purification et de solubilisation de ces domaines chez de nombreux organismes, laissaient ouverte la question du bon repliement de cette région. Elle est pourtant de toute première importance dans l'optique de développement de nouveaux antibiotiques.

Matériel et Méthodes

Les techniques que j'ai utilisées pendant ma thèse sont détaillées dans ce chapitre. Pour plus de clarté, les expériences effectuées par d'autres personnes du groupe sont également mentionnées et partiellement décrites.

I. Clonage, expression et purification de PBP1b-WT

I.1. Clonage de FL-PBP1b-WT

Le clonage initial de la partie périplasmique de PBP1b (FL-PBP1b-WT) a été réalisé par Anne-Marie Di Guilmi au Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules (LIM) à l'IBS et a donné lieu à une publication (Di Guilmi *et al.*, 2003).

L'ADN génomique de la souche de *S. pneumoniae* non encapsulée R6 correspondant à la région extracellulaire de PBP1b (acides aminés G74-P791) a été utilisé comme matrice d'amplification au cours d'une réaction de PCR (« Polymerase Chain Reaction »). Le fragment d'ADN amplifié a ensuite été cloné dans le vecteur d'expression pGEX-4T1 (Amersham Biosciences) permettant l'expression de FL-PBP1b-WT en fusion avec la Gluthation S-transférase (GST) en N-terminal, avec un site de coupure à la protéase TEV permettant d'éliminer l'étiquette GST. Ce plasmide codant pour la partie périplasmique de PBP1b (Figure 25) a ensuite été transformé dans des cellules *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Annexe B).

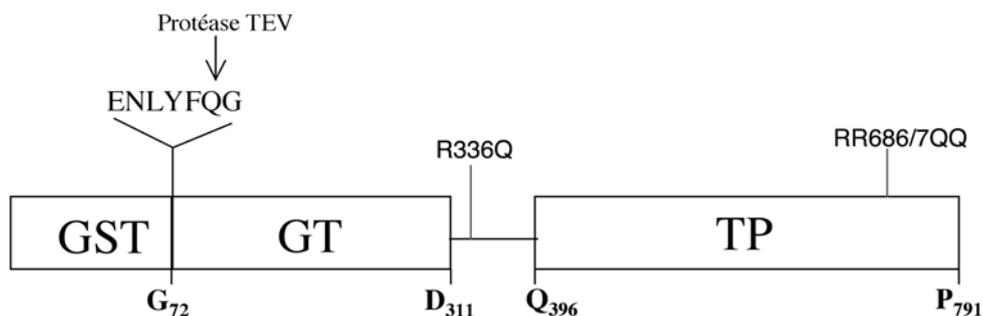


Figure 25 : Schéma de la construction de FL-PBP1b-WT.

I.2. Purification de FL-PBP1b-WT et de son domaine transpeptidase

Une préculture de BL21 (DE3)-pLysS transformée avec le vecteur pGEX-4T1-*fl-pbp1b-wt* est utilisée pour inoculer au 1 /20^{ème}, 2L de LB Broth Lennox (Athena Enzyme Systems) supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline (Euromedex) et de 34 µg/mL de chloramphénicol (Euromedex). Les cellules sont laissées sous agitation à 37°C jusqu'à une D.O._{600nm} ≈ 0.6 U.A., heure à laquelle l'expression de la protéine est induite par 1 mM IPTG (Euromedex), à 16°C sur la nuit.

Les cellules sont centrifugées à 5000 g pendant 15 minutes, le culot est repris dans 80 mL de tampon A : (50 mM tris-HCl-pH 8, 0,1 M NaCl, 1 M EDTA) et une tablette de cocktail d'inhibiteur de protéases Complete® (ROCHE). La solution ainsi obtenue est soumise à un programme de sonication de 12 minutes puis centrifugée à 39200 g pendant 30 minutes. Les protéines solubles sont récupérées dans le surnageant qui est déposé sur une colonne Gluthatione Sépharose (Amersham Pharmacia Biotech) de 5 mL, préalablement équilibrée avec le tampon A. L'élution de GST-PBP1b est réalisée grâce à 50 mL de 10 mM glutathion réduit (Sigma) dans le même tampon A. La solution protéique est ensuite dialysée sur la nuit dans le même tampon pour éliminer le glutathion réduit.

Dans le but d'extraire le domaine TP, la solution est ensuite soumise à un test de coupure protéolytique à la trypsine (Sigma) effectué à température ambiante. Les rapports trypsine / GST-FL-PBP1b-WT (w/w) vont de 1 /100 à 1 /1000, à différents temps. Les échantillons sont analysés sur gel de polyacrylamide (SDS) 12,5 % en conditions dénaturantes pour déterminer la condition de coupure adéquate. En général le domaine transpeptidase est obtenu en utilisant les conditions 1 /1000 pendant 1 heure à température ambiante, après quoi l'activité de la protéase est inhibée par l'ajout de 1 mM PMSF (Sigma). L'échantillon clivé est déposé sur la colonne glutathion Sepharose et les fractions collectées correspondant au domaine TP sont dialysées dans 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA. La protéine est ensuite soumise à une étape de purification sur colonne échangeuse d'anions. Pour cela, la solution est déposée sur une colonne monoQ HR 5/5 de 1 mL (Pharmacia biotech) préalablement équilibrée dans 20 mM Tris-HCl-pH 8, 1 mM EDTA. Le domaine TP est élué grâce à un gradient de NaCl de 0-500 mM puis concentré jusqu'à un volume inférieur à 500 µL et enfin il est déposé sur une colonne d'exclusion Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia biotech) dans 20 mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA. La protéine ainsi obtenue correspond au domaine transpeptidase de FL-PBP1b-WT.

I.3. Séquençage N-terminal

La procédure de purification du domaine TP de FL-PBP1b-WT génère plusieurs produits protéiques analysés par séquençage N-terminal au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire (LEM) à l'IBS par Jean-Pierre Andrieu. Au préalable, 10 µg de protéine correspondant au domaine TP de FL-PBP1b-WT sont séparés sur gel SDS 12,5% qui est ensuite lavé dans un tampon 100 mM CAPS (Sigma) pH 11, 10% méthanol. La membrane PVDF ProBlott™ (Applied Biosystems) préalablement lavée dans du méthanol, est trempée dans ce même tampon puis déposée sur le gel de polyacrylamide. Les protéines sont transférées du gel vers la membrane après application d'un courant de 100V pendant 1 heure. La membrane est ensuite colorée à l'aide de bleu de Coomassie dans 40% méthanol, 1% acide acétique puis décolorée dans 50% méthanol. La bande correspondant à la protéine est découpée et soumise au séquençage N-Terminal par dégradation d'Edman, sur un séquenceur en phase gazeuse modèle 492 (Applied Biosystems).

A partir de ces résultats, les mutations de R336, R686 et R687 en glutamines ont donc été envisagées (Figure 25).

II. Clonage, expression et purification de PBP1b*

II.1. Mutagenèse dirigée de PBP1b : FL-PBP1b*

Le plasmide pGEX-4T1-*fl-pbp1b-wt* double brin est utilisé comme ADN parental pour la mutagenèse dirigée selon la méthode QuickChange (Stratagene). La mutation de l'arginine 336 en glutamine (en gras) et la délétion d'un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction BssSI (souligné) ont été réalisées à partir des oligonucléotides complémentaires l'un de l'autre suivants : 5'CGGTTACAGGAATTTCACAAGACTATTTATACTTTACAA-3' 5'GTTGTAAAGTATAAATAGTCTTGTGAAATTCCTGTAACCG-3'.

La mutation des arginines 686 et 687 en glutamines (en gras) ainsi que la délétion d'un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction BsaAI (souligné) est réalisée à partir des oligonucléotides complémentaires :

5'GATAATCATTTCATTGTCCACAGCAAGCAGGTTATTCTAATAAC-3' et

5'GTTATTAGAATAACCTGCTTGTCTGTGACAATGAATGATTATC-3'.

Les réactions contiennent 10 ng d'ADN parental, 125 ng de chaque oligonucléotide, 10 mM dNTP, 2,5 unités d'enzyme polymérase Pfu Turbo (Proméga) et le tampon de la polymérase (200 mM Tris-HCl pH 8,8, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 1 mg/mL BSA sans nucléase). La mutagenèse s'effectue par PCR avec le programme suivant : 95°C pour 30 secondes, (95°C pour 30 secondes, 55°C pour 1 minute, 68°C pour 14 minutes) 15 fois. Les produits de réactions de PCR sont ensuite digérés par l'enzyme de restriction DpnI ne clivant que les sites méthylés, ceci sélectionnant spécifiquement l'ADN non méthylé et donc synthétisé *in vitro*.

Après transformation dans des cellules JM109 (Annexe B) d'*E. coli*, les clones mutants sont sélectionnés par digestion avec les enzyme de restriction (Biolabs) décrites précédemment puis analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Maniatis *et al.*, 1982). La séquence est vérifiée par Génome Express (Grenoble). Le clone correspondant à FL-PBP1b-WT mutant ainsi crée est appelé FL-PBP1b*.

II.2. Purification de FL-PBP1b* et de son domaine transpeptidase

La protéine périplasmique entière FL-PBP1b* est extraite et purifiée en réalisant une coupure à la protéase TEV, suivie des étapes de purification similaires à celles décrites

précédemment (chapitre I.2.). Les étapes de trypsinisation similaires à celles décrites dans le chapitre I.2. permettent d'extraire le domaine transpeptidase de la protéine FL-PBP1b*, appelée par la suite PBP1b* et qui a donné lieu à des cristaux.

II.3. Production de protéine sélénée

La production de protéine sélénée s'effectue dans les mêmes souches bactériennes BL21 (DE3) pLysS, dont une préculture est utilisée pour inoculer le milieu minimum M9 (Annexe A).

Les bactéries de la préculture sont tout d'abord centrifugées pendant 15 minutes à 3500 rpm, lavées dans du milieu minimum M9 puis sont utilisées pour inoculer 600 mL de milieu minimum M9 au 1/6^{ème}. La culture est ensuite laissée sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} maximum = 0,7 U.A., après laquelle les cellules commencent à lyser. Cette culture est ensuite utilisée pour inoculer 2L de milieu minimum M9 au 1/16^{ème} jusqu'à une DO_{600nm} = 0,6 U.A.. A ce moment, la synthèse de méthionine est bloquée par inhibition de la voie de synthèse des acides aminés dérivant de l'acide aspartique. Ceci est réalisé par addition de lysine, phénylalanine et thréonine à 100 mg/mL qui ont un contrôle allostérique négatif sur la production d'aspartate et d'isoleucine. La leucine et la valine sont ajoutées à 50 mg/mL pour leur rôle dans le contrôle allostérique négatif de la production de thréonine. Enfin on ajoute 60 mg/mL de méthionine sélénée (Sigma). Les cellules sont laissées à 16°C pendant 30 minutes avant induction de la synthèse de protéines par ajout de 1 mM IPTG pendant la nuit, à 16°C.

Les étapes de purification sont identiques à celles décrites plus haut pour la protéine native, avec un ajout de 10 mM DTT dans tous les tampons pour réduire la totalité des méthionines. Le rendement de purification est environ 10 fois inférieur à celui de la protéine native.

III. Clonage, expression et purification des différentes constructions de GT

III.1. Clonage des différentes constructions de GT

Le clonage des différentes constructions de domaines GT de la série Abxx (Figure 26) a été effectué sur la plate-forme de biologie moléculaire et de purification de protéines **RoBioMol** au LIM par Benoît Gallet et Marjolaine Noirclerc-Savoie. Le plasmide pGEX-4T1-*fl-pbp1b** est utilisé comme matrice de PCR et les oligonucléotides sont dessinés en insérant une séquence de clonage dans le vecteur pLX02 (Protein' eXpert) ainsi qu'une séquence signalale en N-terminal correspondant aux acides aminés MAHHHHHHGHQHQL, permettant la purification sur résine de nickel.

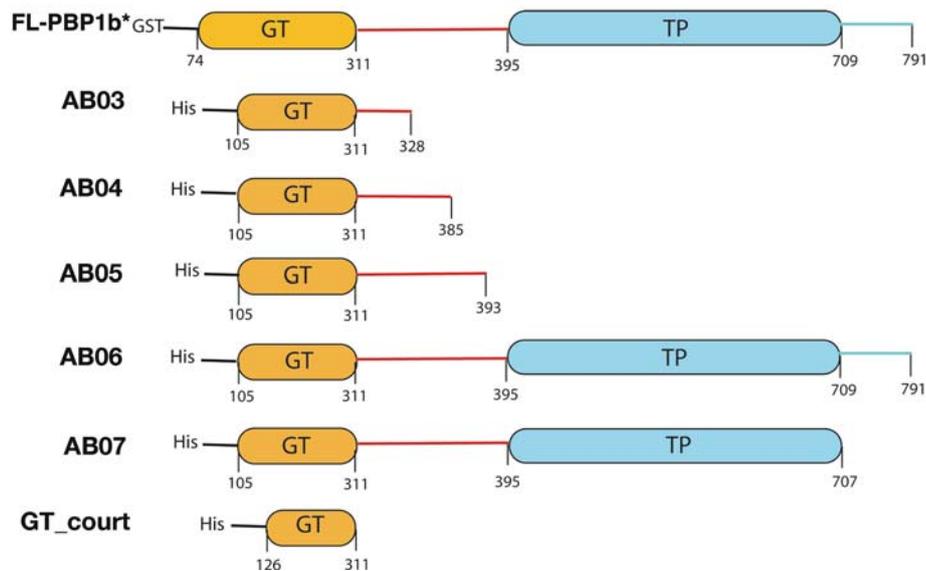


Figure 26 : Schéma des différentes constructions des domaines GT et de PBP1b.
FL-PBP1b* est montré pour comparaison.

Le clonage du domaine GT_court contenant les résidus T126-D311 a été réalisé en deux étapes (Figure 27). La première étape consiste à insérer un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction EcoRI au début de la région de liaison entre les domaines GT et TP, sur le plasmide pGEX-4T1-*fl-pbp1b**. La mutagenèse s'effectue selon le protocole Quickchange présenté plus haut avec les oligonucléotides suivants :

5'-TTAAGCAAAGACGAGAATTCTCAGTACAAGG-3'

5'-CCTTGTACTGAGAATTCTCGTCTTTGCTTAA-3'

La digestion de ce plasmide par les enzymes BamHI et EcoRI (Fermentas) à 37°C pendant 2 heures, génère un plasmide ouvert avec des extrémités cohésives, contenant les parties codant pour la GST, le domaine de liaison et le domaine TP.

Dans un deuxième temps, un fragment d'ADN correspondant au domaine GT est généré par PCR avec les bornes T126 à D311. Les oligonucléotides comprennent les sites de reconnaissance aux enzymes de restriction BamHI en 5' et EcoRI en 3', le dernier étant précédé d'un site de reconnaissance de la protéase Thrombine. Les oligonucléotides suivants ont été utilisés, avec les sites de restriction BamHI en gras, EcoRI en vert et le site codant pour le clivage à la protéase thrombine en rouge.

5'-AAAC**GGATCC**ACTTCTATCTCATCTGAGCAAATTTCCGG-3'

5'-TTGA**ATTC**CTCGGAAC**ACGTGGA**ACTAGGTCTTTGCTTAATGCACCTGTACGATAC-3'

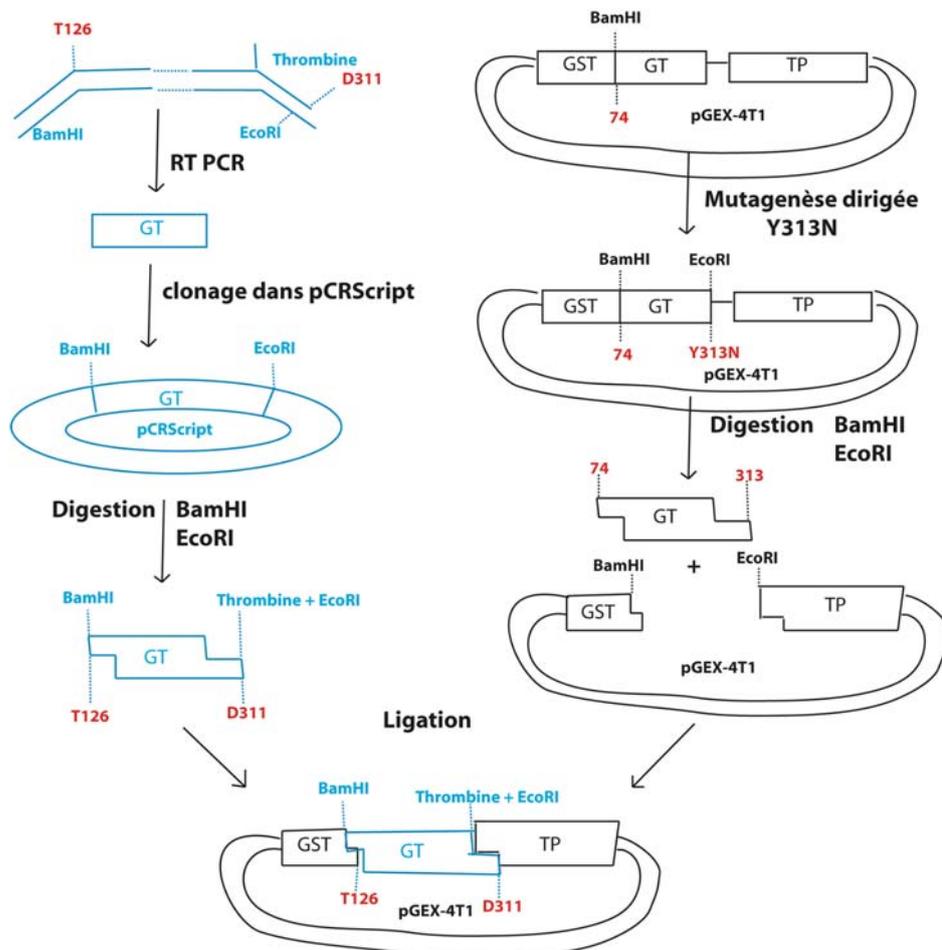


Figure 27 : Schéma montrant la construction du plasmide codant pour la protéine GT_{court}.

L'ADN linéaire ainsi généré est cloné dans un plasmide pCRScript (Stratagene), puis transformé dans les bactéries *E. coli* JM109 pour amplifier le fragment d'ADN d'intérêt.

Nous digérons ensuite le plasmide par les enzymes de restriction BamHI et EcoRI pendant 2 heures à 37°C pour générer le morceau d'ADN codant pour le domaine GT_court avec des extrémités cohésives, correspondant aux extrémités du plasmide pGEX-4T1. Nous réalisons ensuite une ligation du fragment d'ADN avec le plasmide grâce au kit « Ready-To-Go T4 DNA ligase » d'Amersham en suivant les consignes du fournisseur. Les produits de ligation sont transformés dans les bactéries *E. coli* JM109 compétentes pour une étape d'amplification, puis retransformées dans les cellules d'expression *E. coli* BL21(DE3)-pLysS compétentes (Annexe B).

III.2. Tests de purification des constructions GT

Les tests d'expression des différentes constructions GT de la série ABxx effectués par **RoBioMol** sont réalisés dans trois souches d'expression différentes : BL21 (DE3) Codon plus RIL, BL21 (DE3) Codon plus RP (Stratagene) et Origami 2 (Novagen) (Annexe B). L'expression est testée à deux températures différentes : 37°C et 15°C, dans le milieu d'auto-induction présenté en annexe A. Les conditions testées sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS PAGE ainsi que par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette polyhistidines, pour déterminer les conditions d'expression et de solubilité adéquates.

Le rapport présentant les résultats de la campagne de clonage indiquait que les 5 constructions (AB03-AB07) étaient plus solubles dans les souches BL21 (DE3) Codon plus RIL, nous avons donc poursuivi les études avec ces constructions. Les résultats de solubilité n'ayant pas pu être reproduits en grands volumes, nous avons testés différentes conditions d'expression et de purification pour ces 5 clones.

Les bactéries sont mises en culture dans des volumes de 10 mL, soit dans du milieu LB Broth Lennox, soit dans du milieu d'auto-induction, supplémenté de 100 µM d'ampicilline et de 34 µM de chloramphénicol, puis induites à une DO = 0,6 U.A. à 600 nm sur la nuit avec 1 mM IPTG à 16°C. Les cultures sont centrifugées à 5000 rpm pendant 20 minutes puis les culots sont resuspendus dans 3 mL d'un tampon 1 contenant 50 mM Tris pH 8, 0,2 M NaCl et une tablette d'inhibiteur de protéases Complete® ou un tampon 2 correspondant au tampon 1 supplémenté de 1% CHAPS (Sigma). Les différents échantillons sont ensuite soumis à un programme de sonication puis centrifugés à 18000 rpm pendant 40

minutes. Enfin les échantillons sont déposés sur une colonne His-Trap (Pharmacia) chargée avec 100 mM de NiSO₄, lavés dans un tampon A contenant 25 mM Tris pH 7,4, 0,2 M NaCl, 20 mM imidazole, puis élués dans un tampon B contenant 25 mM Tris pH 7,4, 0,2 M NaCl, 500 mM imidazole. Les fractions correspondant à l'échantillon chargé sur la colonne, à celui non retenu sur la colonne et les fractions d'éluion sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrilamide SDS PAGE.

III.3. Purification du domaine glycosyltransférase GT_[74-321]

Le clonage du domaine GT_[74-321] a été réalisé par Anne-Marie Di-Guilmi dans un vecteur pADG41 codant pour les résidus 74-321 en fusion avec une étiquette poly-histidines. L'expression de ce clone dans les cellules BL21 (DE3) pLysS s'effectue en corps d'inclusion, ce qui nécessite quatre étapes de lavage des culots après la sonication. Le premier et le dernier lavage sont réalisés dans un tampon contenant 50 mM Tris pH 8 ; les deux lavages intermédiaires sont effectués dans des tampons contenant respectivement 0,5% Triton X100 pour détruire les interactions électrostatiques entre les particules ou 2 M NaCl pour enlever les protéines en surface des corps d'inclusion. Enfin les protéines en corps d'inclusion subissent une étape de dénaturation dans l'urée à 6 M à 4°C sous agitation pendant 3 heures puis sans agitation sur la nuit. Une première étape de purification sur colonne Chélatant-Sépharose est réalisée avec une éluion du GT_[74-321] à 50 mM d'imidazole, étape après laquelle 18 mg/L de culture sont obtenus. La renaturation des protéines s'effectue par élimination progressive de l'urée par dialyse à 4°C dans un tampon contenant 50 mM Tris pH 8,6, 200 mM KCl, 1 mM ATP, 0,25% CHAPS, 1 mM glutathion réduit, 0,1 M glutathion oxydé.

La dernière étape de purification consiste en une colonne de filtration sur gel sur colonne Hiload Superdex de chez Pharmacia dans le tampon de renaturation.

III.4. Utilisation des anticorps monoclonaux pour stabiliser les domaines GT

III.4.1. Production et purification des Fab

Cinq anticorps monoclonaux murins 1D6, 19B5, 5E9, 4B4, 19F8, ont été élaborés par Patrick Meresse du Laboratoire Hybrisère. La production est réalisée selon quatre étapes. Une première phase d'immunisation de souris est suivie de la fusion entre les cellules myélomateuses et les cellules spléniques de la souris. La troisième phase correspond au clonage permettant l'obtention d'une population de cellules monoclonales et enfin la production en Ascite, permettant l'obtention d'anticorps en quantité importante (1 à 10 mg/mL). Cette dernière étape est suivie par une purification sur colonne d'affinité pour la protéine A et la caractérisation par électrophorèse sur gel SDS PAGE.

Dans le but de générer un système protéine-anticorps simple ainsi que pour limiter la flexibilité du système, nous avons décidé de ne garder que la partie de l'anticorps capable de reconnaître l'antigène : le Fab (« Fragment Antigen Binding ») et d'éliminer la partie Fc (« Fragment cristallisable ») (Figure 28). Pour cela, la solution est soumise à un test de coupure protéolytique à la papaïne (Roche) à température ambiante. Les conditions 'masse papaïne/masse anticorps' vont de 1/100 à 1/400 et sont réalisées à différents temps. Après détermination de la condition adéquate par analyse sur gel SDS PAGE, la coupure à grande échelle est réalisée dans les mêmes conditions puis l'activité de la protéase est inhibée par l'ajout de 10 µg/mL d'inhibiteur de protéases E64 (Roche). L'échantillon clivé est déposé sur une colonne monoQ HR 5/5 de 1mL et les fractions collectées correspondant au Fab sont concentrées à l'aide de centricons YM 30 (Amicon) par ajout de tampon 20mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA.

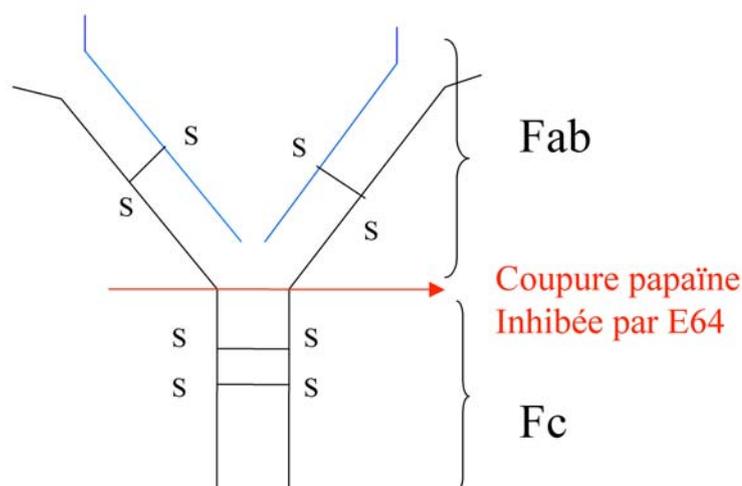


Figure 28: Schéma d'un anticorps monoclonal.

Un anticorps est composé de 2 chaînes légères (en bleu) et 2 chaînes lourdes (en noir). Le fragment qui se lie à l'antigène est appelé Fab et est composé d'une partie constante et d'une partie variable en bout de chaîne. La coupure protéolytique à la papaïne génère 2 fragments Fabs et un fragment Fc responsable de l'activation du système immunitaire.

III.4.2. Complexes GT-Fab

Nous déterminons dans un premier temps, les interactions entre les différents Fabs et les protéines TP et GT. Pour cela, 20 µg de protéine sont mélangés avec 40 µg de Fab. 100 µL de cette solution sont ensuite injectés sur une colonne d'exclusion Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia) et les fractions sont analysées par électrophorèse sur gel SDS PAGE 12,5%.

Dans un deuxième temps, nous déterminons les conditions stoechiométriques d'interaction entre les domaines GT et les Fab spécifiques de ces domaines en mélangeant des rapports protéine/Fab (masse/masse) allant de 1/0,1 à 1/1. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrilamide en conditions natives (sans SDS) avec un courant de 100 V et 30 mA. La protéine est ensuite associée avec son Fab avec une stoechiométrie déterminée précédemment (typiquement 1/1), puis les échantillons sont déposés sur la colonne d'exclusion Superdex 200 HR 10/30 pour éliminer l'excès éventuel de Fab et ne garder que le complexe « GT-Fab ».

IV. Méthodes de caractérisation des protéines

IV.1. Spectrométrie de masse

IV.1.1. Principes

Les échantillons protéiques purifiés sont soumis à une étape de caractérisation par spectrométrie de masse par ionisation électrospray (ESI : Electrospray Ionisation) réalisée au Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines (LSMP) à l'IBS par David Lemaire et David Lascoux. Cette méthode permet d'analyser des particules ionisées dans des champs électriques et d'obtenir leur poids moléculaire à partir de leur rapport masse/charge.

L'échantillon à analyser doit être dans un premier temps ionisé au moyen de la source d'ionisation, dans notre cas ESI. L'échantillon est dissout dans un mélange aqueux (eau-acétonitrile-acide volatile) puis introduit par infusion dans un capillaire porté à un fort potentiel. Le champ électrique créé entre ce capillaire et une contre-électrode dans un flux d'azote chaud permet la formation d'un fin brouillard de gouttelettes chargées. Ces gouttelettes soumises à une atmosphère d'azote chaud vont, par évaporation voir leur taille diminuer et provoquer ainsi leur éclatement par «explosions coulombiennes». Ce phénomène se répète plusieurs fois jusqu'à obtention de l'analyte chargé en phase gazeuse. Les ions formés sont ensuite dirigés *via* l'interface au moyen de gradients de tension et de pression vers l'analyseur de masse où règne un vide poussé et qui permet la séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Le spectromètre de masse utilisé est de géométrie Q-TOF (Quadrupole - Time Of Flight), le Q-TOF Micro (Waters, Manchester, UK). Au cours de nos expériences l'analyseur de type TOF permet de séparer les ions en fonction de leur vitesse, elle-même dépendante de leur masse à énergie cinétique constante pour tous les ions. Les analyseurs TOF mesurent le temps que mettent les ions pour franchir une distance fixe.

IV.1.2. Contrôle qualité par spectrométrie de masse ESI dénaturante

Afin de vérifier si notre protéine purifiée possède bien le poids moléculaire attendu, les échantillons sont concentrés sur centricon® (Millipore) jusqu'à une concentration d'au moins 30 μ M. L'analyse par spectrométrie de masse électrospray peut être réalisée :

- soit après une simple dilution de l'échantillon dans une solution H₂O/CH₃CN (1/1 volume/volume) avec 0,2% acide formique pour dénaturer la protéine,
- soit par dessalage préalable sur une cartouche C4 protein macrotrap en chromatographie liquide. L'échantillon est injecté sur la cartouche, il est dessalé par une solution H₂O, 0,1% acide tri-fluoroacétique, puis la protéine est éluée par une solution à 60% CH₃CN/H₂O (9/1 volume/volume), 0,1% acide tri-fluoroacétique.

Dans les deux cas, l'échantillon est injecté à un débit de 5 µL/min. Les paramètres de la source ESI du spectromètre de masse sont : une tension de capillaire de 3 kV et les voltages du cône d'échantillonnage et du cône d'extraction sont respectivement de 55 V et 2 V. Les spectres de masse sont enregistrés dans une gamme de 500-2100 en rapport *m/z*.

Les résultats sont obtenus en mode positif après un étalonnage du spectromètre de masse à partir des états de charge de la myoglobine de cœur de cheval en solution dans H₂O/CH₃CN (1/1 volume/volume) avec 0,2% acide formique. Les différentes données sont enregistrées et traitées par le logiciel Masslynx (Waters).

IV.1.3. Détermination de la masse du peptide GT par spectrométrie de masse en conditions natives

Pour déterminer le poids moléculaire du peptide GT resté en interaction avec le domaine TP dans la protéine PBP1b* malgré les étapes de purification, les échantillons sont soumis à la fois au séquençage N-terminal et à une analyse par spectrométrie de masse électrospray en conditions non dénaturantes. Les échantillons sont dialysés dans un tampon de 20 mM bicarbonate d'ammonium pH 7,9 pendant 3 heures puis après changement du bain de dialyse, sur la nuit. Les concentrations finales en protéines sont de l'ordre de 20 µM.

L'échantillon est injecté à un débit de 7 µL/min avec des paramètres de tension d'accélération de 3 kV au niveau du capillaire et de 100 V et 10 V respectivement pour les cônes d'échantillonnage et d'extraction. Les spectres de masse sont enregistrés en mode positif entre 2500 et 4500 *m/z*. L'étalonnage du spectromètre de masse est réalisé au préalable avec une solution de CsI à 0,5 mg/mL dans H₂O/Isopropanol (1/1 volume/volume).

IV.1.4. Complexes protéine-inhibiteurs, protéine-substrat

Pour la caractérisation de l'intermédiaire de réaction entre PBP1b* et S2d, nous utilisons un rapport protéine/S2d de 1/20 impliquant des concentrations finales de 235 µM de

PBP1b* et 5mM de S2d. La réaction est arrêtée à différents temps par ajout d'une solution contenant H₂O et 0,1% acide tri-fluoroacétique, puis dessalée sur une cartouche « protein macrotrap » et éluée par une solution à 60% CH₃CN/H₂O (9/1 volume/volume), acide trifluoroacétique 0.1% pour être analysée en spectrométrie de masse dénaturante comme indiqué précédemment au chapitre IV.1.2.

La désacylation de l'intermédiaire réactionnel est effectuée dans les mêmes conditions de concentration que décrites précédemment. La réaction est arrêtée à différents temps allant de 5 secondes à 15 minutes par dilution des échantillons dans une solution H₂O/CH₃CN (1/1 volume/volume) avec acide formique 0,2%. Les échantillons sont analysés sur le spectromètre Q-TOF comme indiqué précédemment.

Les déterminations de la masse exacte des complexes entre la protéine et les différents inhibiteurs sont réalisées avec un rapport protéine/inhibiteur de 1/1, le mélange est alors analysé par spectrométrie de masse par électrospray à une concentration en protéine de 500 nM.

IV.1.5. Mesures de la stabilité des complexes protéines-inhibiteurs par spectrométrie de masse

La stabilité des complexes protéine-inhibiteur est déterminée de façon qualitative par spectrométrie de masse. Les mesures de k_3 déterminées en spectrométrie de masse en mesurant la hauteur des pics de protéine libre et de protéine acylée, puis normalisées, utilisées précédemment pour PBP2x. (Mouz *et al.*, 1998) est discutable en raison de l'approximation des mesures de hauteur des pics. Nous avons préféré ne pas déterminer des valeurs de k_3 précises par cette méthode mais nous avons tout de même mesuré des valeurs de stabilité de complexes qui peuvent être assimilées à des constantes de désacylation (voir figure 30).

Les mesures effectuées sont réalisées en mélangeant l'échantillon protéique et l'inhibiteur en conditions stœchiométriques 1:1 à température ambiante. Différents aliquotes réactionnels sont ensuite prélevés à différents temps, dilués dans une solution contenant H₂O/CH₃CN (1/1 volume/volume), 0,2% acide formique. Ils sont ensuite analysés par spectrométrie de masse par électrospray comme indiqué précédemment.

IV.2. La diffusion dynamique de lumière (DLS)

La technique de DLS mesure des fluctuations d'intensité en fonction du temps qui apparaissent lorsque des particules sont soumises au mouvement Brownien. L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet de déterminer un coefficient de diffusion des particules qui sont converties en distribution de taille puis en rayon hydrodynamique. Il est également possible d'en déduire le taux de polydispersité de la molécule, qui représente une déviation standard de la taille de la particule reportée à son rayon. Cette valeur permet d'apprécier le taux d'agrégation et d'oligomérisation de la protéine. En prenant pour modèle une molécule globulaire, nous pouvons également estimer sa masse moléculaire.

Le degré de polydispersité est donc estimé pour toutes les protéines purifiées et susceptibles d'entrer dans le processus de cristallogenèse. Les échantillons en fin de purification sont concentrés à environ 5 à 10 mg/mL puis centrifugés à 125000 g dans une ultracentrifugeuse et enfin déposés dans une cuvette perpendiculairement au faisceau laser dans un appareil de diffusion dynamique de lumière DynaPro. Les variations d'intensité sont analysées grâce au programme Dynamics.

IV.3. Le dichroïsme circulaire

IV.3.1. Principes

Lorsqu'on fait interagir de la lumière polarisée circulairement avec des molécules chirales, on observe une interaction entre ces molécules et l'onde électromagnétique. On mesure l'absorbance d'un échantillon chiral avec de la lumière polarisée successivement à droite et à gauche et on observe une différence $\Delta A = A_g - A_d$. Avec un trajet optique « l » et une concentration « C », le pouvoir dichroïque molaire est considéré comme étant $\Delta \epsilon = \epsilon_g - \epsilon_d = \Delta A / lC$ ($\Delta A < 1\%$ Abs totale). Dans le cas des protéines, il est plus simple de considérer les contributions des structures secondaires. Par exemple, une hélice α (3,6 résidus/tour) possède un pouvoir dichroïque négatif à 222nm et 208nm et un positif vers 190-195nm tandis que le feuillet β possède un dichroïsme négatif plus faible à 211nm (figure 29).

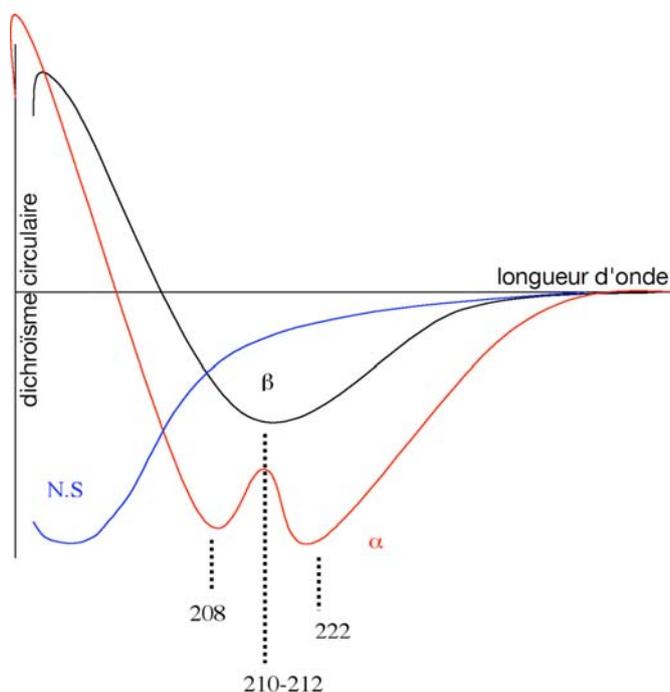


Figure 29 : Schéma théorique du dichroïsme circulaire.

L'absorption caractéristique des feuillets β est représentée en noir avec un minimum entre 210 et 212 nm, les hélices α possèdent deux minima à 208 et 222 nm (en rouge) et les entités non structurées (N.S.) possèdent une absorption caractéristique représentée en bleu.

IV.3.2. Comparaison des protéines FL-PBP1b* et FL-PBP1b-WT par dichroïsme circulaire

La protéine est dialysée sur la nuit dans un tampon contenant 10 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl. On utilise un polariseur de lumière gauche/droite à 10000 hertz (spectropolarimètre Jasco J-810) qui mesure une absorbance, convertit en pouvoir dichroïque molaire ou ellipticité molaire par résidu ($\theta = (\delta \times 0,1) / (\text{concentration molaire en M} \times \text{longueur de la cuve en cm} \times \text{nombre d'acides aminés})$). Dans un premier temps, on mesure l'absorbance de la cuve de 1 cm seule, puis l'absorbance de FL-PBP1b-WT à 1,8 μM, l'absorbance de FL-PBP1b* à 2,4 μM, l'absorbance de la céfotaxime seule à 4 μM et enfin l'absorbance de FL-PBP1b* à 2,4 μM complexée avec 4 μM de céfotaxime.

Les mesures de pouvoir dichroïque en fonction de la dénaturation thermique sont effectuées sur le même spectropolarimètre avec une lumière d'excitation à 222 nm, couplé avec un TCV 250 Peltier permettant de monter la température de la cuve par paliers. Les échantillons sont analysés jusqu'à une température de 95°C toutes les 5 secondes par le programme Biokine.

IV.4. Etudes fonctionnelles de PBP1b

L'équation cinétique classique d'inhibition des PBP par les antibiotiques de la famille des β -lactamines correspond à celui présenté dans la Figure 30 :

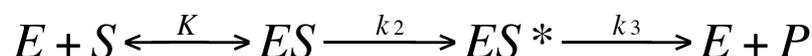


Figure 30 : Schéma de l'interaction entre les PBP et les antibiotiques de la famille des β -lactamines

E représente l'enzyme, S le substrat, ES le complexe Michaelis-Menten non covalent, ES* le complexe covalent, P le produit de la réaction. K représente la constante de dissociation du complexe non covalent, k_2 la vitesse d'acylation et k_3 la vitesse de désacylation du complexe covalent.

IV.4.1. Caractérisation de l'efficacité d'acylation.

L'équation précédente (figure 30) est classiquement utilisée chez les PBP (Adam *et al.*, 1997; Jamin *et al.*, 1993) et permet de déterminer des vitesses d'acylation et de désacylation des complexes covalents et non covalents. Les deux premières étapes caractérisées par les constantes K et k_2 sont rapides tandis que la dernière étape de désacylation est considérée comme une étape lente. La détermination individuelle des constantes n'est pas possible en raison de la vitesse trop importante de la réaction. En revanche, nous pouvons mesurer une efficacité d'acylation k_2/K en mesurant les variations de fluorescence intrinsèques de la protéine au cours du temps grâce à un fluorimètre couplé à un mélangeur rapide (Frere *et al.*, 1975; Jamin *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1973). On utilise le fluorimètre avec une longueur d'excitation à 280 nm et un détecteur située à 90° pour lequel la longueur d'onde d'émission a été sélectionnée entre 305 et 360 nm. L'appareillage de fluorimètre couplé à un mélangeur rapide (SFM-400 Bio-Logic) est utilisé pour injecter des échantillons de protéine à une concentration de 0,3 μ M dans un tampon 50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA et des solutions d'inhibiteurs à différentes concentrations allant de 50 μ M à 800 μ M dans un bain thermostaté à 37°C.

Neuf mesures de décroissance de fluorescence en fonction du temps sont obtenues dans les mêmes conditions. On détermine alors une constante de vitesse k_{app} par minimisation de l'écart entre la courbe exponentielle expérimentale et une courbe théorique représentative de l'exponentielle :

$$\text{Fluo}_t - \text{Fluo}_\infty = (\text{Fluo}_0 - \text{Fluo}_\infty) \cdot \text{Exp}(-k_{app} \cdot t)$$

par le programme Bio-Kine (Bio-Logic). L'efficacité d'acylation k_2/K est ensuite déterminée en disposant sur un graphique les différentes valeurs de k_{app} en fonction des différentes concentrations d'antibiotiques par l'équation : $k_{app} = (k_2/K)/[\text{antibiotique}]$ grâce au programme Kaleidagraphe. Un exemple de graphique déterminant la constante d'acylation pour PBP1b par la céfalothine est montré en Figure 31.

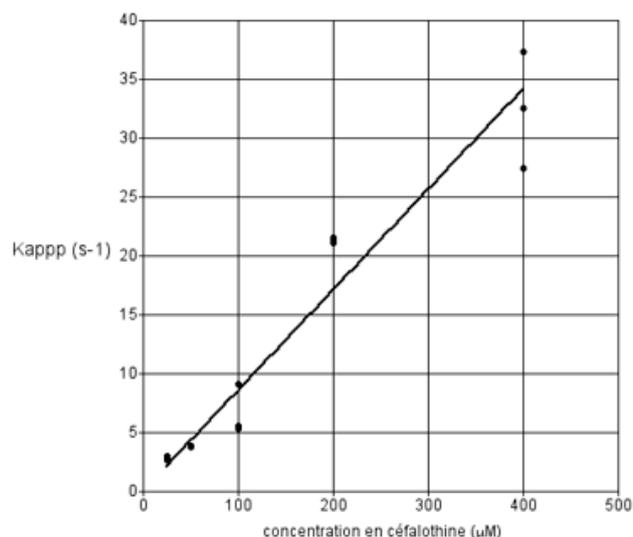


Figure 31 : Exemple de calcul de k_{app} .
Les variations de la constante de vitesse d'acylation (k_{app}) de PBP1b en fonction de la concentration en céfalothine sont représentées.

IV.4.2. Caractérisation de la transpeptidation.

Nous avons réalisé les expériences de transpeptidation sur HPLC avec une détection des produits à 250 nm. Le S2d est utilisé à une concentration finale de 100 µM. On ajoute une solution de PBP1b à 19 µM final. Les accepteurs D-alanine, L-lysine et N-acétyl-L-lysine-D-alanine-D-alanine sont utilisés à 58 mM. Le temps de réaction est de cinq minutes, puis on réalise l'injection et une élution à 85% eau-TFA, 15% acétonitrile.

V. Techniques de bactériologie

Les mesures des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des inhibiteurs lactivicine et TB-3-48, synthétisés par l'équipe de C. Schofield de l'Université d'Oxford, sont effectuées sur des géloses au sang de Columbia EH (Difco™) avec 4% de sang de cheval. Ces géloses sont supplémentées de différentes concentrations d'inhibiteurs puis déposées dans des boîtes 12 puits permettant d'accueillir 1 mL de gélose. Nous avons déterminé les CMI sur la souche R6 au laboratoire. Les bactéries sont cultivées dans un milieu Todd hewitt jusqu'à atteindre une DO = 0,6 U.A. à 600 nm sur la nuit, dans un incubateur à 37°C, dans une atmosphère à 5% CO₂. Ces cellules sont ensuite étalées sur les géloses. Les bactéries qui n'ont pas assez d'inhibiteur pour être inhibées vont hémolyser le sang de cheval qui deviendra marron. La détermination des CMI se fait donc à l'œil entre les boîtes restées rouges et celles devenues marrons.

Nous avons réalisé des mesures de CMI sur deux souches de pneumocoques résistants aux antibiotiques fournies par le professeur Jacques Croizé du CHU de Grenoble : la souche 38040505 venant d'un patient de l'hôpital de Chambéry possédant un antibiogramme CMI pénicilline : 1 µg/mL, CMI Amoxicilline : 1 µg/mL et CMI céfotaxime : 0,5 µg/mL. La souche 38030509 d'un patient venant de l'hôpital de Briançon possède des CMI pénicilline : 2 µg/mL, amoxicilline : 4 µg/mL et céfotaxime : 1 µg/mL.

Les CMI pour la pénicilline ont été déterminées une nouvelle fois à l'aide de bandelettes E-test® (AB Biodisk)

VI. Etudes structurales de PBP1b*

VI.1. Introduction à la cristallographie des rayons X

L'observation de l'arrangement des atomes constituant les macromolécules que nous cherchons à étudier, implique l'utilisation d'ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde est de l'ordre de grandeur de l'objet à observer. Dans le cas de la cristallographie aux rayons X, particulièrement adaptée à la visualisation de ces objets, on utilise le rayonnement X dont la longueur d'onde est de l'ordre de l'Angström (10^{-10} m). L'interaction entre ces rayons et une molécule génère une diffusion de faible intensité, c'est pour cela que nous utilisons un cristal composé de molécules empilées de façon régulière et périodique dans l'espace pour augmenter cette intensité.

VI.1.1. Cristallogenèse

La cristallisation implique un rapprochement des macromolécules en augmentant les interactions entre les molécules de protéines, en excluant une partie du solvant.

La méthode utilisée est celle de la diffusion de vapeur en goutte suspendue (McPherson *et al.*, 1995) dans laquelle on mélange sur une lamelle, une goutte de protéine dans un tampon contenant un agent précipitant (des sels non chaotropiques, des solvants organiques ou des polymères), avec une goutte d'un réservoir contenant le même agent précipitant. La lamelle est placée au dessus du réservoir et scelle celui-ci hermétiquement. L'équilibre des concentrations s'établit entre la goutte et le réservoir par diffusion des espèces volatiles entraînant une diminution du volume de la goutte et donc une augmentation de la concentration de la protéine et de l'agent précipitant.

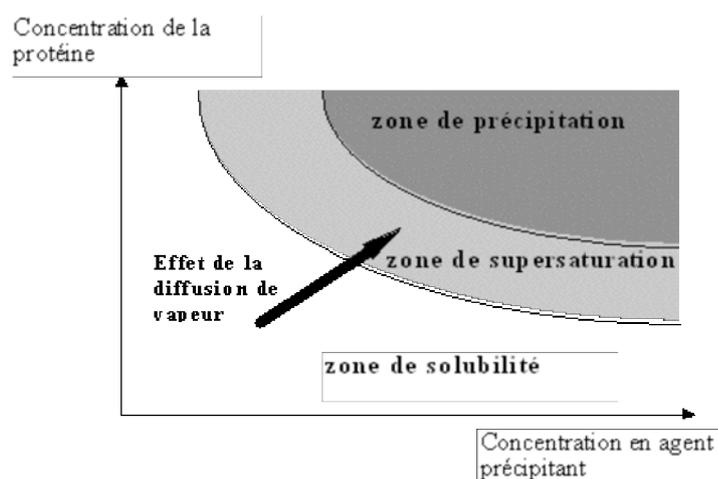


Figure 32 : Diagramme du processus de cristallogenèse.

La flèche indique l'évolution du système lors de la diffusion de vapeur. D'après : <http://www.lbpa.ens-cachan.fr/bentley/cristallogenese.html>

Le diagramme de phase présenté dans la Figure 32 montre que lors des étapes de concentration de la protéine et de l'agent précipitant, la solubilité de la protéine diminue jusqu'à atteindre une zone de supersaturation favorable à l'obtention de cristaux.

Les cristaux ainsi formés sont soumis à un rayonnement X provenant soit d'un générateur de laboratoire, soit d'un synchrotron. Le rayonnement provoque la formation de radicaux libres à l'intérieur du cristal pouvant endommager les molécules. On effectue donc une étape préliminaire de congélation de ces cristaux pour éviter les dommages radiatifs. Pour ce faire, on utilise des solutions dites cryoprotectrices qui empêchent l'eau de cristalliser et d'entraîner une forte dégradation du cristal lors de l'expérience de radiation.

VI.1.2. Le principe de diffraction des rayons X par un cristal de protéine.

L'interaction entre le rayonnement X et les électrons de la matière utilisée en radiocristallographie, se traduit par la diffusion de ce rayonnement de façon élastique, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de perte d'énergie entre l'onde incidente et l'onde diffusée. Lorsque la matière est ordonnée de façon périodique, les ondes diffusées vont interagir par interférences qui ne sont constructives que dans des directions privilégiées : on parle alors du phénomène de diffraction. Ces directions particulières sont décrites à l'aide de 3 nombres entiers h, k, l , les indices de Miller, et l'onde diffusée par une maille élémentaire du cristal est décrite par une amplitude et une phase reliées au facteur de structure F_{hkl} défini par la relation :

$$F_{hkl} = \sum_j f_j e^{2i\pi(hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (1)$$

On effectue la somme des facteurs de diffusion atomiques f_j sur tous les atomes j de la maille, de coordonnées réduites x_j, y_j, z_j .

Le facteur de structure F_{hkl} correspond à la transformée de Fourier de la densité électronique $\rho(x, y, z)$.

Le facteur de structure peut s'exprimer sous la forme d'un nombre complexe mettant en avant les deux composantes de l'onde:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}}$$

Par transformée de Fourier de l'équation (1), on peut avoir accès à la densité électronique $\rho(x, y, z)$ en tout point du cristal par l'équation suivante, V étant le volume de la maille :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2i\pi(hx+ky+lz)} \quad (2)$$

Lors d'une expérience de diffraction, les clichés obtenus permettent de déterminer l'intensité de l'onde diffractée dans une direction $h k l$, qui est proportionnelle au carré du module du facteur de structure. En revanche l'information concernant la phase n'est pas connue. On ne peut donc pas calculer directement la densité électronique à partir des clichés de diffraction.

Les conditions générales de diffraction sont données par l'expression de la loi de Bragg. On considère q_0 le vecteur d'onde incident et q le vecteur d'onde diffusé, schématisés sur la Figure 33, faisant un angle entre eux de 2θ .

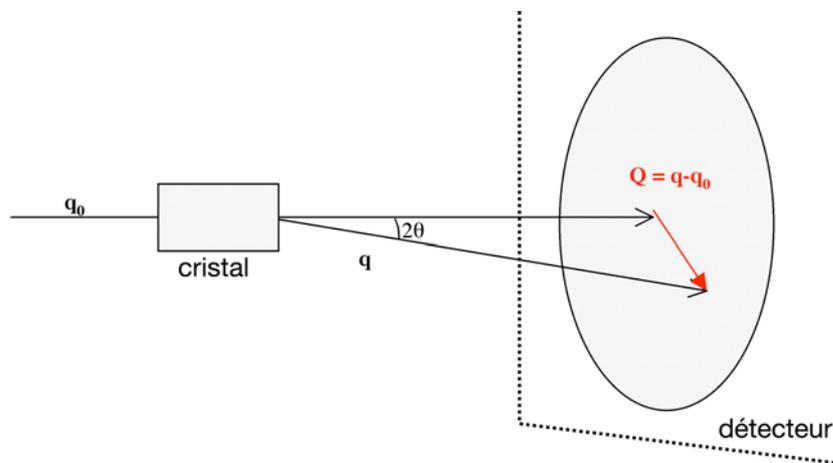


Figure 33 : Schéma de la diffusion élastique d'un rayonnement.

Le vecteur de diffusion Q est défini comme $Q = q - q_0$

On peut définir des familles de plans réticulaires d'indices entiers h, k, l dont la distance réticulaire est donnée par d_{hkl} . La diffraction aux rayons X , pouvant être assimilée à une réflexion sur ces plans réticulaires, n'est obtenue que pour des valeurs de θ vérifiant :

$$2d_{hkl} \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$$

avec n un nombre entier et λ la longueur d'onde des rayons X .

On peut ainsi introduire l'idée de résolution limite d , à laquelle on ne pourra distinguer que les détails séparés d'une distance de l'ordre de $d/2$ avec

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\max}}$$

VI.1.3. Détermination des intensités de diffraction

Les clichés de diffraction obtenus sont traités dans le but d'extraire les valeurs d'intensité associées à chaque indice de Miller h, k, l . Toutes ces étapes ont été effectuées avec les programmes DENZO (Otwinowski and Minor, 1997) ou XDS (Kabsch, 1993).

La répartition des taches de diffraction permet d'extraire des informations concernant le réseau cristallin. L'étape d'**indexation** permet de mesurer des vecteurs entre les pics de diffraction ce qui permet de déterminer la maille du cristal.

Lors de l'étape d'**intégration**, l'intensité des réflexions est déterminée en appliquant un masque autour de la réflexion. La partie intérieure du masque correspond à la partie à intégrer alors que la partie extérieure correspond au bruit de fond qui sera retranché à l'intensité de la réflexion.

L'ensemble des taches de diffraction est ensuite **mis à l'échelle** et **réduite** en ajoutant les contributions des réflexions équivalentes par symétrie ou enregistrées plusieurs fois et en tenant compte de l'intensité du rayonnement incident pour chacune des images pendant l'enregistrement. Enfin il est possible de calculer le module du facteur de structure.

La qualité du jeu de données peut alors être estimée par une valeur du facteur R_{sym} qui permet de comparer l'intensité de chaque réflexion équivalente par la symétrie du cristal, à la valeur moyenne de ces réflexions :

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} |I_{hkl} - \langle I \rangle|}{\sum_{hkl} I_{hkl}}$$

On définit également un rapport signal sur bruit, $I/\sigma(I)$ qui permet de donner une estimation de l'intensité moyenne des réflexions mesurées en fonction de la résolution, où I est l'intensité des réflexions et $\sigma(I)$ est l'écart type des intensités des réflexions, correspondant au bruit de fond.

VI.1.4. Résolution du problème de la phase.

Comme indiqué précédemment, l'expérience de cristallographie permet d'avoir accès au module du facteur de structure, mais l'information concernant chacune des phases des ondes diffractées est perdue. Les deux techniques utilisées pour déterminer ces phases et que je présenterai dans ce manuscrit sont la diffusion anormale et le remplacement moléculaire.

Dans le cas de la diffusion anormale, on utilise les propriétés particulières d'un atome lourd excité dans son seuil d'absorption pour déterminer sa position précise au sein de la structure cristalline puis pour déterminer les phases globales du cristal.

Le remplacement moléculaire peut être utilisé dans le cas d'un cristal constitué d'une protéine dont la structure est proche d'une molécule de structure connue. On utilise cette structure comme modèle pour la détermination des phases.

VI.1.4.1. La loi de Friedel

A partir de l'expression (1), on peut dire que lors d'une expérience de diffraction classique, les facteurs de structure de deux réflexions h, k, l et $-h, -k, -l$ appelées paires de Friedel, sont des nombres complexes conjugués, c'est-à-dire qu'ils ont même module et une phase de signe opposé. Ceci peut être représenté graphiquement sur le diagramme d'Argand de la figure 34. Si on considère les facteurs de structure de la protéine F_p , du diffuseur anormal F_a et de la structure totale F ainsi que les paires de Friedel de chaque facteur de structure appelées F^+ correspondant à $F(h, k, l)$ et F^- correspondant à $F(-h, -k, -l)$, on peut représenter le cas d'une structure dérivée lors de la diffraction classique dans le diagramme suivant:

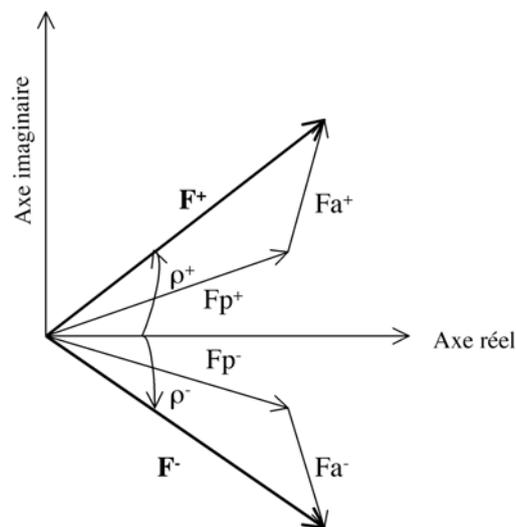


Figure 34 : Diagramme d'Argand montrant la loi de Friedel.
 ρ^+ et ρ^- correspondent aux phases de F^+ et F^- respectivement.

VI.1.4.2. La diffusion anormale

Généralités

Lorsque l'énergie de l'onde incidente s'approche de l'énergie de liaison des électrons des couches internes d'un atome, celui-ci entre en résonance et son facteur de structure peut s'écrire

$$\lambda f = {}^0f + \lambda f' + i\lambda f'' \quad (3)$$

Le premier terme de l'expression (3) : 0f est indépendant de la longueur d'onde ; les deux termes suivants dépendent eux de la longueur d'onde λ et sont décomposés en une partie réelle et une partie imaginaire.

Les valeurs des paramètres f' et f'' sont déterminées en mesurant les variations de la diffusion anormale dans le voisinage du seuil d'absorption du diffuseur.

Si on reprend le diagramme d'Argand de la figure 34 dans le cas de la diffraction anormale, la structure complète du facteur de structure du diffuseur anormal possède trois composantes dont la partie imaginaire possède un déphasage de $+\pi/2$ (figure 35).

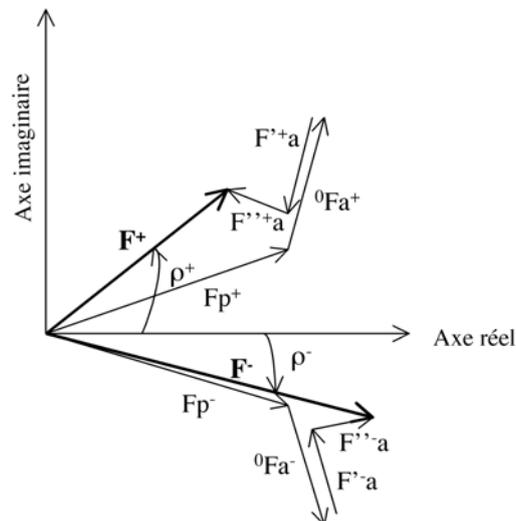


Figure 35 : Diagramme d'Argand dans le cas de la diffusion anormale.

Il apparaît que la loi de Friedel est brisée, c'est-à-dire que F_{hkl} (F^+) et F_{-h-k-l} (F^-) ne sont plus complexes conjugués et, en particulier, que leurs modules sont différents.

Détermination des sous structures des diffuseurs anomaux

Si on définit les paires de Bijvoet comme étant les équivalents des paires de Friedel par symétrie, on peut calculer la différence entre les modules des facteurs de structure pour chaque paire de Bijvoet, appelée la différence de Bijvoet $\Delta F = |F^+| - |F^-|$.

On calcule généralement cette différence à la longueur d'onde correspondant au maximum de f'' , là où la différence est la plus grande.

On peut alors calculer une carte de Patterson avec ΔF^2 comme coefficient. Cette carte correspond approximativement à une fonction d'auto-corrélation des diffuseurs anomaux qui présentent des maxima aux points correspondant aux distances interatomiques, permettant de déterminer la position des atomes lourds dans la structure.

Détermination graphique de la phase

Lors de l'introduction d'un atome lourd dans des cristaux de protéine, le facteur de structure de l'équation (1) peut être divisé en plusieurs termes rendant compte de la contribution de cet atome:

$$F_T(hkl) = F_P(hkl) + F_A(hkl) \quad (4)$$

avec F_T correspondant au facteur de structure total, F_P à celui de la protéine et F_A à celui de l'atome lourd.

Le facteur de structure de la protéine F_P recherché peut s'écrire comme

$$F_P(hkl) = F_T(hkl) - F_A(hkl) \quad (5),$$

avec $F_A(hkl)$ préalablement déterminé en module et en phase.

Il faut noter que lors d'une expérience de diffusion anormale, on utilise un même cristal sur lequel on enregistre plusieurs jeux de données à plusieurs longueurs d'onde différentes (méthode MAD). On choisit souvent 3 longueurs d'onde, une correspond au maximum de f'' pour laquelle la différence entre les F^+ et les F^- est la plus grande, une longueur d'onde au minimum de f' et une longueur d'onde loin du seuil d'absorption du diffuseur permettant de déterminer le module du facteur de structure de la protéine native. On peut considérer qu'aux deux premières longueurs d'onde, le diffuseur anormal se comporte comme deux dérivés différents.

On peut représenter l'équation (5) sur le diagramme d'Argand suivant (figure 36) :

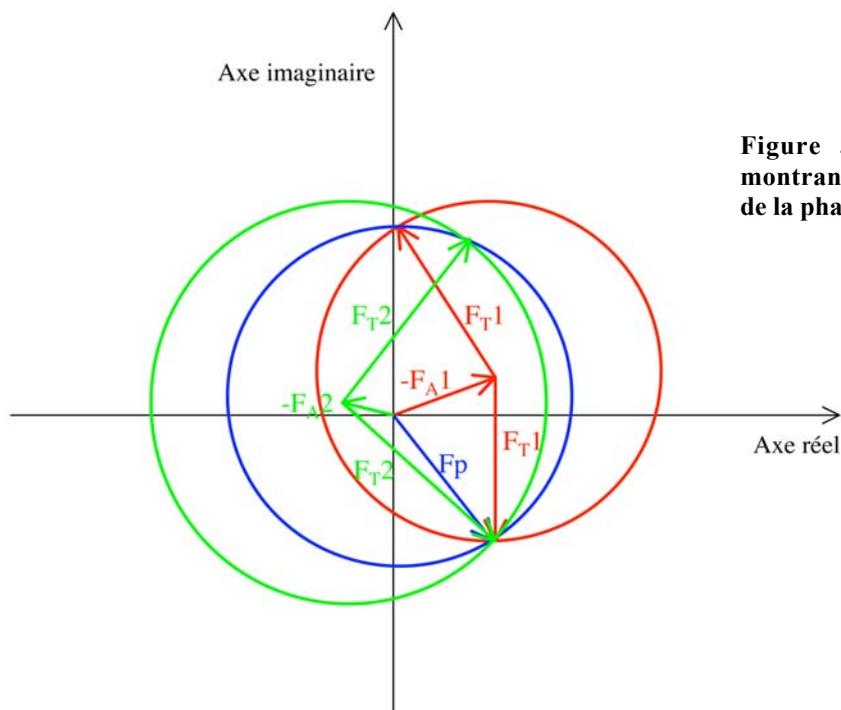


Figure 36 : Diagramme d'Argand montrant la détermination graphique de la phase par la méthode MAD.

Le module du facteur de structure F_P correspondant à la protéine est connu par la mesure des intensités de diffraction à la longueur d'onde loin du seuil d'absorption du diffuseur anomal. On peut donc tracer un cercle de rayon correspondant au module de F_P (cercle bleu). La fonction de Patterson permet de déterminer précisément la position des diffuseurs anomaux, nous permettant d'avoir accès au module et à la phase de F_A (en rouge). A une longueur d'onde de l'expérience, on connaît la valeur du module du facteur de structure de la protéine en complexe avec le diffuseur anomal F_{T1} (cercle rouge). L'intersection entre les cercles bleus et rouges donnent deux solutions pour la phase de F_P . L'utilisation de la deuxième longueur d'onde permet de déterminer la valeur du module de F_{T2} (cercle vert), et de lever l'ambiguïté en ce qui concerne la phase de F_P (à l'intersection des cercles bleu, rouge et vert).

VI.1.4.3. Le remplacement moléculaire

On utilise la méthode de phasage par remplacement moléculaire lorsque l'on dispose d'une structure cristallographique d'une protéine possédant typiquement plus de 25% d'identité de séquence en acides aminés avec notre protéine d'intérêt.

La méthode consiste à calculer les fonctions de Patterson représentant l'ensemble des vecteurs interatomiques d'une molécule, pour le modèle cristallographique et pour la structure recherchée. Une première étape consiste à déterminer les trois angles d'Euler ($\theta_1, \theta_2, \theta_3$) pour lesquels la fonction de corrélation entre la fonction de Patterson du modèle orienté et celle issue de la structure inconnue, est maximale (Rossman and Blow, 1962). Après avoir déterminé l'orientation du modèle, ce dernier doit être positionné en translation pour donner le meilleur accord entre les facteurs de structure calculés et mesurés. Les six paramètres d'orientation et de translation sont finalement affinés par affinement de corps rigide.

VI.1.5. Affinement des structures

De la densité électronique au modèle

A partir des phases expérimentales déterminées soit par la méthode MAD soit par remplacement moléculaire, on peut construire un modèle initial à l'intérieur de la densité électronique calculée grâce à l'équation (2).

La procédure d'affinement permet de corriger le modèle initial afin d'obtenir un accord optimal entre les modules des facteurs de structure observés et ceux calculés à partir du modèle. En pratique, on procède en alternant des étapes de reconstruction manuelle du modèle initial avec des étapes d'affinement numérique des paramètres du modèle (position et agitation de chaque atome).

L'affinement dans l'espace réel

Les étapes de reconstruction manuelle du modèle sont effectuées sur station graphique en utilisant des logiciels de visualisation du modèle et des cartes de densité électroniques. Les cartes de densité utilisées sont essentiellement des cartes dites différences ou cartes résiduelles ; elles illustrent le désaccord entre le modèle et les facteurs de structure observés. On peut calculer des cartes ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}}$) interprétées comme $\rho_{\text{obs}}(\text{xyz}) - \rho_{\text{calc}}(\text{xyz})$ et appelées par la suite Fo-Fc, appelée carte résiduelle. Elle illustre le désaccord entre le modèle et les facteurs de structure observés. Un pic positif s'interprète comme des atomes manquant dans le modèle. Un pic négatif sur un atome du modèle indique que celui-ci est sans doute mal placé. A la fin de l'affinement, cette carte résiduelle doit être aussi « plate » que possible. On utilise également la carte ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}, \phi_{\text{calc}}$) appelée par la suite 2Fo-Fc. Elle représente une combinaison linéaire de la carte de densité électronique et de la carte résiduelle. Elle

permet de visualiser la densité électronique tout en tenant compte des imperfections du modèle.

L'affinement dans l'espace réciproque

Les étapes d'affinement numériques permettent de réduire l'écart entre les facteurs de structure observés et calculés en affinant les paramètres géométriques du modèle. En général, en fonction de la résolution, le nombre d'observations issu des facteurs de structure observés est inférieur au nombre de paramètres à affiner (position des atomes et facteur d'agitation thermique), ce qui ne permet pas à l'affinement de converger convenablement. Pour cela on augmente généralement le nombre d'observations en imposant des contraintes géométriques et stéréochimiques au modèle (longueurs de liaison et angles de liaisons standard). On ajoute donc des restrictions en apportant une information externe de stéréochimie dont les paramètres standard ont été déterminés à partir de petites molécules.

On utilise en général une grandeur caractéristique de l'état d'avancement de l'affinement, le facteur R que l'on essaie de minimiser :

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k|F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}$$

Ce facteur R fait partie de la fonction à minimiser, il n'est donc pas complètement objectif ; on utilise alors le facteur R_{free} qui est calculé à partir de données exclues de l'affinement et comparées en fin de processus. On compare ainsi les facteurs de structure du modèle affiné F_{calc} avec les facteurs de structure expérimentaux F_{obs} (calcul du facteur R) et les F_{calc} avec les F_{obs} (exclus) (calcul du facteur R_{free}). Une diminution du facteur R sans diminution corrélée du facteur R_{free} indique un affinement inefficace qui consiste à faire entrer artificiellement dans le modèle le bruit des cartes de densité électroniques.

Le programme REFMAC5 (CCP4, 1994) permet d'affiner les structures par des méthodes de minimisation des coordonnées atomiques du modèle en déterminant les contraintes structurales (liaisons atomiques, angles de liaisons...) et en calculant les facteurs de structure en module et en phase puis en les mettant à l'échelle par rapport aux facteurs de structure observés. L'affinement à proprement parler permet de maximiser une fonction de vraisemblance contenant les paramètres à affiner décrits par des distributions de probabilité.

Les molécules chimiques dont les coordonnées et la géométrie sont inconnues, sont définies dans le programme Monomer Library Sketcher (CCP4, 1994) pour créer une bibliothèque contenant la liste des atomes, la charge formelle de chaque atome ainsi que la liste des liaisons interatomiques.

La méthode de recuit simulé utilisée dans le programme CNS (Brünger *et al.*, 1998), part du principe que la structure du modèle peut être très éloignée de la réelle structure, avec une fonction énergétique bloquée dans un minimum local. On applique alors à chaque atome du modèle une énergie cinétique lui permettant de sortir du minimum dans lequel il était bloqué, en franchissant les barrières d'énergie. En diminuant la température par paliers, on peut amener le modèle dans un nouveau minimum d'énergie plus bas.

VI.2. cristallogénèse et cristallographie de PBP1b*

Les premiers essais de cristallisation du domaine transpeptidase de FL-PBP1b-WT ou de la forme périplasmique entière ont été initiés en 1999 au laboratoire. Les résultats préliminaires concernant le domaine transpeptidase n'ayant abouti qu'à des microcristaux, nous nous sommes principalement intéressés au domaine transpeptidase issu de la protéine mutante : PBP1b*, dont la purification a été décrite au chapitre II.

VI.2.1. Cristallogénèse du domaine PBP1b*

La méthode utilisée est celle de diffusion de vapeur en goutte suspendue, réalisée à différentes températures (20°C, 15°C, 8°C, 4°C) et à différentes concentrations de protéine. Deux approches ont été utilisées, la première étant une approche classique utilisant les méthodes de criblage grâce aux kits et aux additifs Hampton. Les conditions sont ensuite affinées grâce à des produits de chez SIGMA. Les plaques 24 puits sont remplies de 1mL de solution de précipitant et les gouttes sont réalisées sur des lamelles de verre (Hampton) grâce à 1µL de solution du puits et 1µL de protéine concentrée.

La deuxième approche a été l'utilisation de la plateforme de cristallisation à haut débit de l'IBS. Il a été possible de réaliser le criblage de 6 fois 96 conditions préétablies grâce à 8 aiguilles qui prélèvent et déposent 1µL de solution du puits et 1µL de protéine concentrée. Ces conditions ayant été testées sur le domaine PBP1b* ainsi que sur des complexes GT-Fab.

Les cristaux de PBP1b* ont été obtenus en mixant 1 µL de protéine purifiée à environ 6-7 mg/mL avec 1 µL d'une solution A contenant 50 mM HEPES pH 7.0 ; 0,8 M (NH₄)₂SO₄ ;

2,8 M NaCl à 15°C. Les cristaux obtenus sont ensuite plongés dans une solution cryoprotectrice contenant la solution A supplémentée de 20% éthylène glycol avant d'être congelés dans de l'azote liquide.

VI.2.2. Enregistrement des données de diffraction

Le jeu de données MAD a été enregistré sur la ligne de lumière BM30A de l'ESRF permettant de modifier les longueurs d'onde pendant l'expérience. Dans le cas de l'enregistrement de données MAD, un cristal de PBP1b* sélénée a été utilisé pour réaliser un spectre de fluorescence au seuil d'absorption du sélénium grâce au programme Rontec, puis analysé par le programme CHOOCH permettant d'analyser les variations des coefficients f' et f'' en fonction des variations de l'énergie des photons incidents. Nous avons donc choisi la longueur d'onde correspondant au seuil d'absorption du sélénium pour lequel la valeur de f'' est maximale comme longueur d'onde du « pic » à 0,9803 Å. La deuxième longueur d'onde utilisée correspond au minimum de f' (l'inflexion) à 0,9805 Å. Enfin, nous avons choisi une troisième longueur d'onde de référence à 0,9778 Å.

VI.2.3. Structure de PBP1b*

Les données correspondant aux trois longueurs d'onde enregistrées sur PBP1b* sélénée ont été traitées en utilisant les logiciels DENZO et SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997). Le phasage a été réalisé par la méthode de dispersion anormale MAD en utilisant le signal du sélénium. 16 méthionines ont été localisées dans l'unité asymétrique par le programme SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) en utilisant les données diffractant à 2,4 Å de résolution. Les phases ont ensuite été améliorées par aplatissage de solvant grâce au programme RESOLVE (Terwilliger, 1999) qui a placé 418 résidus sur 494 attendus en polyalanines. Le modèle initial a été reconstruit manuellement en utilisant le programme QUANTA (Molecular Simulations, Waltham, MA) puis utilisé comme modèle dans une expérience de remplacement moléculaire en utilisant les données de PBP1b* native diffractant à 1,9 Å grâce au programme AMORE (Navaza, 2001). Ce modèle est ensuite affiné à l'aide du programme CNS (Brünger *et al.*, 1998) grâce à des cycles successifs de recuit simulé, minimisation d'énergie, affinement des facteurs B et des occupations.

VI.3. Structures de PBP1b* en complexes avec des inhibiteurs et un pseudo-substrat

VI.3.1. Complexes entre PBP1b* et des inhibiteurs et un substrat

Le complexe de PBP1b* avec le S2d a été réalisé en mélangeant de la protéine à une concentration finale d'environ 8 mg/mL avec une concentration finale de 5 mM de S2d. Les cristaux sont obtenus dans les mêmes conditions que pour PBP1b* natif.

Tous les complexes entre PBP1b* et des solutions d'inhibiteur ont été réalisés à partir de cocristaux PBP1b*-S2d, préalablement lavés de l'excès de S2d dans la solution A (50 mM HEPES pH 7 ; 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,8 M NaCl) puis retrempés dans des solutions d'inhibiteur. Les conditions propres à toutes les solutions d'inhibiteur utilisées sont présentées ci-dessous :

- Complexe nitrocéfine : lavage du cristal dans 2 μL de solution A, puis ajout de 3 μL de 633 μM nitrocéfine pendant 1h30 puis 1,5 μL pendant 1h30.
- Complexe céfotaxime : lavage dans 2 μL de solution A, suivi de l'ajout de 2 μL de 320 μM de céfotaxime pendant 1h15.
- Complexe AcLys-céphalosporine : lavage dans 2 μL de solution A puis ajout de 3 μL de 633 μM de AcLys-céphalosporine pendant 1h30, puis 1.5 μL pendant 2h
- Complexe AcLys-pénicilline : lavage dans 2 μL de solution A, puis ajout de 3 μL de 633 μM de AcLys-pénicilline pendant 2h, rajouter 1.5 μL pendant 5h.
- Complexe lactivicine : lavage dans 2 μL de solution A, puis ajout de 2 μL de 68 mM lactivicine pendant 15 minutes.
- Complexe TB-3-48 : lavage dans 2 μL de solution A puis ajout de 2 μL de 60 mM de TB-3-48 pendant 4 minutes.

VI.3.2. Collectes des données de diffraction

Les données de diffraction obtenues sur les complexes avec le S2d et des inhibiteurs sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	PBP1b*- nitrocéfine	PBP1b*- céfotaxime	PBP1b*- AcLys- pénicilline	PBP1b*-AcLys- céphalosporine	PBP1b*- lactivicine	PBP*-TB- 3-48	PBP1b*- S2d
Ligne de lumière	BM30	ID14-EH2	ID14-EH3	ID29	ID14-EH2	ID23-EH2	BM30
Longueur d'onde (Å)	0,979	0,933	0,931	0,975	0,933	0,873	0,979

Tableau 2 : Résumé des enregistrements de données réalisés sur les complexes de PBP1b* avec des inhibiteurs.

Tous ces jeux de données ont été indexés et intégrés par le programme XDS (Kabsch, 1993).

VI.3.3. Résolution des structures de complexes

Les structures de PBP1b* en complexe avec le S2d ou des inhibiteurs ont été résolues par la méthode de remplacement moléculaire en utilisant le programme AMORE. Le modèle utilisé pour le remplacement moléculaire est celui de la structure native de PBP1b* dont les résidus 460 en N-terminal de l'hélice α_2 , 516 à 518 au niveau des hélices α_4 et α_5 et 651 à 660 sur les brins β_3 et β_4 manquent pour éviter de biaiser le modèle.

L'affinement a été réalisé par alternance de cycles d'affinement numérique grâce au programme REFMAC5 (CCP4, 1994) et de modélisation manuelle à l'aide du programme COOT (Emsley and Cowtan, 2004).

VII. Etudes structurales de PBP1b par diffusion de rayons X aux petits angles

VII.1. Introduction au SAXS

Comme expliqué précédemment dans le chapitre IV.1.2. et la figure 33, on peut définir les vecteurs suivants :

\mathbf{q}_0 le vecteur d'onde incident $|\mathbf{q}_0| = \frac{2\pi}{\lambda}$.

\mathbf{q} le vecteur d'onde caractéristique de l'onde diffusée, sa direction indique la direction d'observation. Lors d'une diffusion élastique, $|\mathbf{q}| = |\mathbf{q}_0|$.

\mathbf{Q} le vecteur de diffusion, $\mathbf{Q} = \mathbf{q} - \mathbf{q}_0$ et son module $|\mathbf{Q}| = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$ avec 2θ : l'angle de diffusion.

L'amplitude de l'onde diffusée par une particule de densité électronique $\rho(r)$ est

$$A(\mathbf{Q}) = \iiint_V \rho(r) e^{i\mathbf{Q} \cdot \vec{r}} d^3r.$$

L'approximation de Debye, valable dans le cas des solutions diluées et isotropes, repose sur deux hypothèses. La première postule qu'il n'y a pas de corrélation entre l'orientation des différentes molécules en solution et la seconde, qu'il n'y a pas d'interférence entre deux ondes diffusées par deux molécules différentes. Dans ce cas, si N est le nombre de particules identiques diffusantes, l'intensité observée est égale à : $I(\mathbf{Q}) = N \langle |A(\mathbf{Q})|^2 \rangle$, en moyennant sur toutes les orientations moléculaires possibles.

Dans le cas d'une particule en suspension dans un solvant, la diffusion aux petits angles dépend de la différence entre la densité électronique de la particule $\rho(r)$ et celle du solvant $\rho(s)$. Dans ce cas, l'expression finale de $I(\mathbf{Q})$ vaut

$$I(\mathbf{Q}) = \left\langle \left| \iiint_V (\rho(r) - \rho(s)) e^{i\mathbf{Q} \cdot \vec{r}} d^3r \right|^2 \right\rangle \quad (6)$$

VII.2. Détermination des paramètres structuraux

Aux petits angles, dans le domaine dit de Guinier pour lequel $\vec{Q} \cdot \vec{r} \ll 1$, en supposant qu'une seule espèce est présente en solution, on peut réaliser un développement limité de l'exponentielle (6) pour conduire à la loi de Guinier :

$$I(Q) = I(0) \exp\left[-\frac{1}{3} Rg^2 Q^2\right] \quad (7),$$

où Rg est le rayon de giration de la particule, c'est-à-dire la distance quadratique moyenne de tous les points de la particule au centre de gravité pondéré par la masse diffusante (le contraste de densité électronique) en chaque point :

$$Rg^2 = \frac{\int r^2 (\rho(r) - \rho(s)) dr}{\int (\rho(r) - \rho(s)) dr}$$

La loi de Guinier s'écrit plus souvent sous sa forme logarithmique :

$$\ln I(Q) \cong \ln I(0) \cdot \left(-\frac{1}{3} Rg^2 Q^2\right)$$

Une simple régression linéaire permet ainsi de déterminer deux paramètres : l'ordonnée à l'origine est $\ln I(0)$ et la pente est $Rg^2/3$.

La masse moléculaire

L'intensité $I(0)$ diffusée à $Q = 0$, normalisée par la concentration c de la solution est proportionnelle à la masse molaire M de la particule étudiée :

$$\frac{I(0)}{c} = \frac{N_A M}{\mu^2} (1 - \rho(s)\psi)$$

Avec N_A le nombre d'Avogadro, $\rho(s)$ la densité électronique du solvant, $\psi = \frac{1}{\rho(r)}$ est le

volume électronique spécifique moyen et $\mu = \frac{M}{n}$ avec n , le nombre d'électron. En théorie,

la valeur de μ pour une protéine vaut 1,87 g/mol/électron. Puisque nous ne connaissons pas tous les paramètres de l'équation ci-dessus, l'expérience est calibrée avec une protéine de masse moléculaire connue, le lysozyme. Si on considère que μ et ψ sont à peu près les

mêmes pour toutes les protéines, $\frac{N_A}{\mu^2} (1 - \rho(s)\eta)^2$ peut être considérée comme une constante k et on peut ainsi déterminer la masse moléculaire de la protéine étudiée grâce à l'équation $I(0) = kM$.

Le rayon de giration

La pente de la droite $\text{Ln}(I(Q))$ en fonction de Q^2 permet de calculer le rayon de giration de l'espèce diffusante. On considère que cette relation n'est valable que dans un domaine restreint de Q, typiquement $Q < 1,3/R_g$.

Ce rayon de giration permet d'accéder à une première indication concernant la forme de la particule. En effet, pour un volume donné et de masse moléculaire donnée, une molécule avec un rayon de giration le plus petit possible, correspond à une sphère de même volume. Plus le rayon de giration est grand, à volume constant, moins la particule est sphérique.

Fonction de distribution des distances p(r)

La fonction p(r) est un histogramme de distribution des distances interatomiques dans la molécule étudiée. Elle contient les mêmes informations que I(Q) et se définit comme :

$$p(r) = \frac{1}{\pi} \int_0^{\infty} r \frac{Q}{2\pi} I(Q) \sin rQ \cdot dQ.$$

La fonction p(r) est égale à zéro pour les distances supérieures à l'extension maximale de la particule D_{\max} .

Le calcul de la fonction p(r) à partir des données d'intensité de diffusion, s'effectue selon des méthodes de transformation de Fourier indirecte introduite pour la première fois par O. Glatter (Glatter, 1977) et dont plusieurs versions sont proposées dans différents programmes de calcul. Nous avons utilisé ici le programme GNOM, mis au point par D. Svergun (Svergun, 1992). De la fonction de distribution des distances p(r), nous pouvons calculer les valeurs de I(0) et de Rg :

$$I(0) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) dr$$

$$Rg^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} r^2 p(r) dr}{2 \int_0^{D_{\max}} r^2 p(r) dr}$$

La détermination des paramètres $I(0)$ et R_g est moins sensible que par la méthode de Guinier en ce qui concerne les interactions entre les molécules et la présence d'oligomères en solution, puisque la méthode tient compte de toute la courbe de diffusion et non pas des points aux très petits angles.

L'allure de la fonction $p(r)$ permet d'évaluer quelques caractéristiques de la forme globale de la molécule étudiée : les molécules globulaires ont une $p(r)$ en forme de cloche, dont le maximum correspond à $D_{\max}/2$; les particules allongées ont un maximum de $p(r)$ pour $r < D_{\max}/2$; la fonction $p(r)$ des particules aplaties présente un maximum élargi pour $r < D_{\max}/2$ tandis que celle de particules trouées présente un maximum pour $r > D_{\max}/2$.

VII.3. Collecte et traitement des données

VII.3.1. Montage expérimental et enregistrement des données

Toutes les expériences de collecte des données de diffusion aux petits angles ont été enregistrées sur la ligne de lumière ID2 de l'ESRF en collaboration avec Stéphanie Finet, à une longueur d'onde de $0,995 \text{ \AA}$.

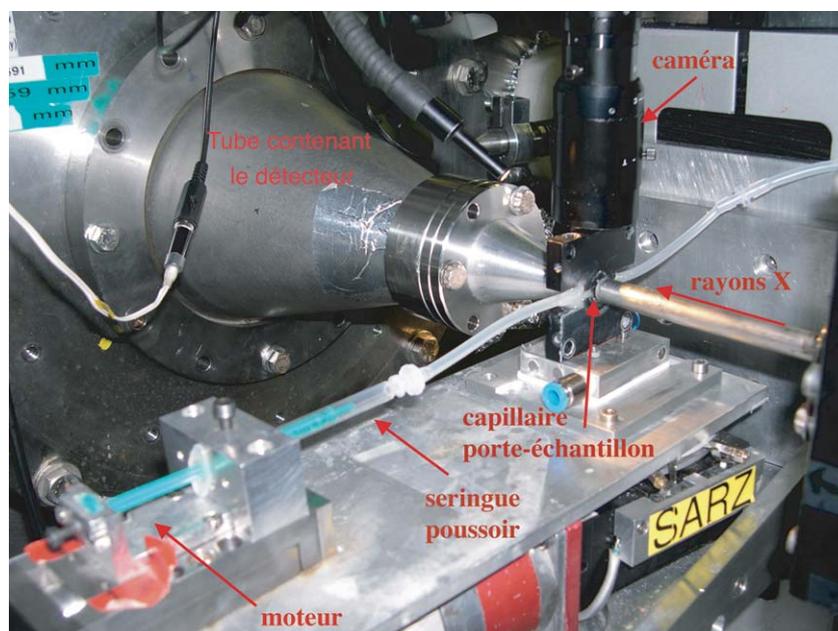


Figure 37 : montage expérimental utilisé lors de l'enregistrement des données de diffusion des rayons X aux petits angles sur la ligne ID2 de l'ESRF.

La figure 37 ci-dessus montre le montage expérimental que nous avons utilisé lors des enregistrements de données. L'échantillon est injecté dans un capillaire en quartz d'environ 2 mm de diamètre ; une série de 10 spectres est enregistrée sur un échantillon d'environ $30 \mu\text{L}$.

de volume en poussant de la solution fraîche face au faisceau entre chaque spectre grâce à un moteur relié à une seringue poussoir. On applique un temps de pause de 5 secondes entre chaque poussée et on pousse entre 1 et 2 fois le volume irradié pour limiter les conséquences de la formation de radicaux libres.

Le détecteur est situé à l'intérieur d'un tube sous vide et peut être déplacé de façon automatique: <http://www.esrf.fr/UsersAndScience/Experiments/SCMatter/ID02/BeamlineDescription>.

On réalise des séries de mesures des intensités de diffusion, pour une distance échantillon-détecteur de 3 mètres puis de 1 mètre sur le lysozyme, FL-PBP1b* et PBP1b* à plusieurs concentrations en protéine. Pour chaque échantillon, une dizaine d'images sont enregistrées avec un temps d'acquisition de 0,1 à 0,3 seconde. Pour chaque échantillon, on enregistre une trentaine d'images du tampon correspondant. Le tampon du lysozyme est 50 mM sodium acétate pH 4,5, 100 mM NaCl, 5% glycérol et le tampon de PBP1b* : 50 mM HEPES pH 7, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA. Le résumé des paramètres des jeux de données enregistrés est présenté dans le tableau ci-dessous :

échantillon	Distance échantillon-détecteur	Nombre d'images	Temps d'irradiation par image
Lysozyme 2 mg/mL	3 mètres	6	0,1 seconde
Tampon lysozyme	3 mètres	30	0,1 seconde
Lysozyme 4 mg/mL	3 mètres	10	0,1 seconde
FL-PBP1b* 1.375 mg/mL	3 mètres	10	0,3 seconde
Tampon PBP1b*	3 mètres	30	0,3 seconde
FL-PBP1b* 2.75 mg/mL	3 mètres	9	0,3 seconde
FL-PBP1b* 5.5 mg/mL	3 mètres	10	0,3 seconde
Tampon PBP1b*	3 mètres	20	0,3 seconde
PBP1b* 1.75 mg/mL	3 mètres	9	0,3 seconde
PBP1b* 3.5 mg/mL	3 mètres	10	0,3 seconde
PBP1b* 7 mg/mL	3 mètres	10	0,3 seconde
Lysozyme 4 mg/mL	1 mètre	10	0,1 seconde
Tampon lysozyme	1 mètre	20	0,1 seconde
Lysozyme 10 mg/mL	1 mètre	10	0,1 seconde
FL-PBP1b* 5.5 mg/mL	1 mètre	10	0,3 seconde
Tampon PBP1b*	1 mètre	20	0,3 seconde
FL-PBP1b* 10 mg/mL	1 mètre	10	0,3 seconde
PBP1b* 7 mg/mL	1 mètre	5	0,3 seconde

Tableau 3 : Résumé des expériences de SAXS réalisées sur la ligne ID2 de l'ESRF.

VII.3.2. Détermination expérimentale des paramètres structuraux

Les paramètres globaux ont été extraits des courbes de diffusion par Patrice Vachette à l'Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire de l'Université Paris-sud.

Tout d'abord, les courbes de diffusion sont analysées par le programme PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003) qui permet de soustraire les courbes de diffusion de la protéine avec celles du solvant. Ce programme permet également de mettre à l'échelle les courbes correspondant aux différentes concentrations utilisées et enfin, de faire coïncider les courbes de diffusion enregistrées avec une distance échantillon-détecteur de 1 mètre pour lesquelles $0,01 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0,53 \text{ \AA}^{-1}$ et celles à 3 mètres ($0,01 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0,18 \text{ \AA}^{-1}$). Ce programme permet, parmi bien d'autres fonctions, de déterminer les valeurs de rayon de giration et de $I(0)$ par le calcul de la courbe de Guinier.

Enfin, en utilisant le programme GNOM, il est possible d'évaluer la fonction de distribution des distances interatomiques $p(r)$, nous donnant accès au rayon de giration de la molécule ainsi que la valeur de D_{\max} .

VII.3.3 Modélisation *ab initio*

Principes

Les données de diffusion aux petits angles sont ensuite utilisées pour déterminer une enveloppe de FL-PBP1b* et de PBP1b* grâce au programme DAMMIN (Svergun, 1999).

Le point de départ de la méthode consiste à remplir une sphère de rayon D_{\max} déterminé précédemment, par un ensemble de boules (pseudo-atomes) disposées sur un réseau hexagonal compact. Chaque boule peut appartenir soit à la protéine (index = 1), soit au solvant (index = 0). Une procédure de recuit simulé est utilisée pour déterminer la combinaison binaire (chercher la position des boules), permettant de correspondre à la courbe de diffusion en minimisant une fonction du type $E(r) = \chi^2 + P(x)$ où χ^2 mesure l'écart entre les données expérimentales et les données calculées :

$$\chi^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n \left[\frac{\mu \langle c(Q) \rangle I_{\text{mod}}(sQ) - I_{\text{exp}}(sQ)}{\sigma(sQ)} \right]^2$$

avec $\sigma(sQ)$ représentant les erreurs expérimentales, μ un coefficient de mise à l'échelle, n le nombre de points sur lesquels on effectue la mesure, $\langle c(Q) \rangle$ un facteur de correction, I_{mod} et I_{exp} étant les valeurs d'intensité du modèle et expérimentales respectivement. $P(x)$ correspond à un terme de pénalité permettant d'assurer la compacité et la connectivité de la molécule. Par défaut, le rayon des sphères est fixé à 2,75 Å.

Application à FL-PBP1b*

Puisque la méthode de détermination de l'enveloppe de la particule décrite plus haut utilise le recuit simulé, nous avons réalisé 10 cycles indépendants du programme DAMMIN pour évaluer la stabilité de la solution et obtenir le modèle le plus probable. Lors de cette procédure, le programme DAMAVER (Volkov and Svergun, 2003) aligne les différents modèles deux à deux et détermine une pseudo-distance (normalized Spatial Discrepancy NSD) entre les modèles et un modèle pris comme référence. Tous les modèles ainsi superposés et l'enveloppe contenant tous ces modèles sert comme volume initial pour un ultime calcul par DAMMIN.

VII.3.4 Modélisation par reconstruction à partir d'un modèle existant

Principes

Nous avons tout d'abord utilisé le programme CREDO (Petoukhov *et al.*, 2002) dans le but d'ajouter à notre structure cristallographique de PBP1b* le domaine manquant correspondant au domaine GT. Comme DAMMIN décrit plus haut, la procédure utilise une approche par recuit simulé. Cependant une différence importante tient au choix de l'élément diffusant dont l'assemblage représente la particule. Au lieu de considérer un ensemble de boules identiques dont la seule fonction est de remplir un volume, le programme manipule des pseudo-résidus centrés sur la position des carbones α et en nombre égal au nombre de résidus de la partie à modéliser *ab initio*. Le nombre de ces pseudo-résidus est connu et la tâche consiste à déterminer les coordonnées de tous ces pseudo-résidus tout en essayant de faire correspondre les courbes de diffusion expérimentales et calculées. Le domaine connu est fixé et le domaine manquant est rempli de N pseudo-résidus correspondant au nombre de résidus manquants dans la structure complète. Pour assurer la connectivité de l'ensemble, la distance entre deux pseudo-résidus voisins est au moins de 3,8 Å.

Nous avons utilisé un deuxième programme, le programme BUNCH (Petoukhov and Svergun, 2005) pour modéliser le domaine GT en partant de la structure cristallographique de PBP1b*. Contrairement au programme CREDO qui réduit le modèle cristallographique à un ensemble de pseudo-résidus, le programme BUNCH représente la protéine en utilisant la description atomique à haute résolution du ou des domaine(s) connu(s) et représentée par des pseudo-résidus pour la (ou les) partie(s) inconnue(s). Les amplitudes partielles de diffusion du domaine connu sont calculées grâce au programme CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995). Les amplitudes des pseudo-résidus de la partie inconnue sont calculées en utilisant le facteur de forme d'un résidu moyen. Le programme BUNCH détermine alors la position et l'orientation relative des domaines ainsi que la forme probable des particules inconnues de telle manière que la courbe de diffusion calculée de l'ensemble soit aussi proche que possible de la courbe expérimentale sous des contraintes de connectivités et de compacité (pour la partie inconnue) similaires à celles utilisées dans le programme CREDO. En particulier, le programme considère par défaut que la partie manquante est compacte et impose une pénalité contraignant le rayon de giration de celle-ci à rester très proche d'une valeur typique pour un domaine compact.

Application à FL-PBP1b*

Nous avons utilisé le programme CREDO dans lequel nous fixons la structure cristallographique de PBP1b* native contenant les résidus 108-110 et 337-788 et nous imposons le nombre de résidus dans le domaine manquant à 260 résidus.

En ce qui concerne le programme BUNCH, les amplitudes de PBP1b* sont calculées grâce au programme CRY SOL en omettant les résidus 108-110. La séquence protéique de la protéine entière permet d'obtenir une première approximation de la protéine entière en remplaçant les parties connues à la bonne place. Différentes contraintes concernant le rayon de giration du domaine GT ont été testées.

Programmes	Fonction
PRIMUS	Soustraction et mise à l'échelle des courbes de diffusion. Détermination du R_g à partir de l'approximation de Guinier.
GNOM	Calcul de la $p(r)$, du R_g et du D_{max} .
DAMMIN	Modélisation <i>ab initio</i> .
CREDO	Modélisation d'un domaine manquant dans une structure cristallographique, celle-ci étant réduite à une succession de pseudo-résidus centrés sur les $C\alpha$.
BUNCH	Modélisation d'un domaine manquant dans une structure cristallographique celle-ci est décrite de manière atomique.
CRYSOL	Calcul de la courbe de diffusion théorique, correspondant à une structure cristallographique.
DAMAVR	Superposition des modèles deux à deux et détermine des valeurs de NSD.

Tableau 4 : Résumé des programmes utilisés pour analyser les données de diffusion des rayons X aux petits angles.

Résultats et Discussion

I. Détermination de la structure du domaine transpeptidase de PBP1b et mécanisme d'activation

I.1. Structure de PBP1b* sous sa forme native

I.1.1. Purification de PBP1b*

Purification de FL-PBP1b-WT natif

Les premiers travaux concernant PBP1b ont été réalisés grâce à une collaboration entre le LCM et le LIM à l'IBS (Di Guilmi *et al.*, 2003) et ont permis de réaliser les premières caractérisations de cette protéine. Les premiers essais de cristallisation de la protéine périplasmique entière n'ayant pu aboutir, nous avons choisi de réaliser une protéolyse ménagée de FL-PBP1b-WT de façon à produire une construction protéique plus stable. Pour cela, nous avons réalisé des digestions ménagées à la trypsine, protéase dont il existe de nombreux sites de coupures à l'intérieur du domaine GT.

Les premières purifications de la protéine, comme décrites dans la publication précédente, ont permis d'extraire de 4 à 6 mg/L de culture d'*E. coli*. L'analyse sur gel SDS des fractions de protéine purifiée montre clairement la présence de plusieurs fragments résultant de la digestion tryptique à 40 kDa, 35 kDa et 13 kDa (Figure 38) qui ne correspondent pourtant qu'à une seule protéine de 52 kDa lors de la purification sur colonne d'exclusion.

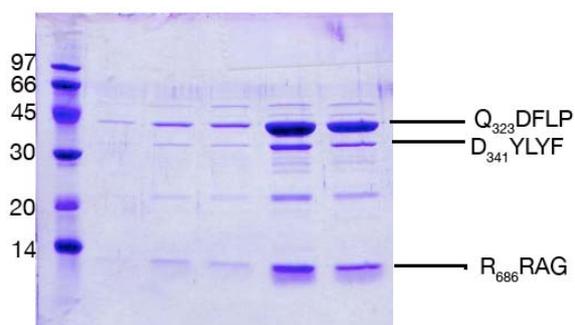


Figure 38 : Gel SDS montrant l'élué de la colonne de filtration sur gel de FL-PBP1b-WT protéolysé à la trypsine.

La première piste représente la marqueur de poids moléculaire et les fractions suivantes, l'élué de la colonne montrant les différentes bandes correspondant aux produits de digestion tryptique. Les séquences sur la droite représentent les résultats du séquençage N-terminal.

Les analyses effectuées précédemment ont permis de montrer que seuls les fragments de plus haut poids moléculaire avaient la capacité de fixer la [³H]-benzylpénicilline (Di Guilmi *et al.*, 2003) ; ceux-ci correspondraient bien au domaine transpeptidase. Le

séquençage N-terminal a permis de montrer que les bandes de 40 kDa et 35 kDa étaient représentatives des coupures protéolytiques après les résidus K₃₂₂ et R₃₄₀ respectivement, générant une protéine dont la séquence N-terminale était Q₃₂₃DFLP et D₃₄₁YLYF respectivement. La bande de 13 kDa correspond à une coupure protéolytique après R₆₈₆.

Les essais de cristallogénèse sur cette protéine, FL-PBP1b-WT tryptinisée, ont donné lieu à des microcristaux dans les conditions 100 mM acétate de sodium pH 4.6, 0.2 M (NH₄)₂SO₄, 15% PEG 4000 ou 8000 (Figure 40A). La qualité de ces cristaux n'a jamais pu être améliorée, probablement en raison de la flexibilité du domaine transpeptidase isolé après l'étape de protéolyse limitée. Il nous est apparu impératif de réaliser des mutations dans ce domaine, dans le but d'éliminer ces sites de coupure interne.

Mutagenèse dirigée du domaine transpeptidase et purification de PBP1b*

Nous avons réalisé les mutations des résidus R₃₄₀Q, R₆₈₆Q et R₆₈₇Q par mutagenèse dirigée avec le kit QuickChange comme indiqué dans la partie Matériel et Méthodes. La digestion grâce aux enzymes de restriction BssSI et BsaAI ainsi que le séquençage effectué par Génome Express, a pu confirmer la présence des mutations. La protéine entière périplasmique contenant ces trois mutations sera par la suite appelée FL-PBP1b*.

Nous avons réalisé l'expression et la purification de FL-PBP1b* dans les mêmes conditions que pour la protéine FL-PBP1b-WT. Le rendement de la purification atteint de 4 à 7 mg par litre de culture. Les étapes de purification successives et de coupure à la trypsine indiquent que la protéine possède une masse apparente de 50 kDa (Figure 39) qui pourrait correspondre à une protéine dont les résidus N-terminaux seraient Q₃₂₃DFLP, ce qui serait bien en accord avec la masse théorique calculée de 51412 Da. Par la suite, j'appellerai la protéine mutante, tryptinisée, qui a conduit à des cristaux, PBP1b*.

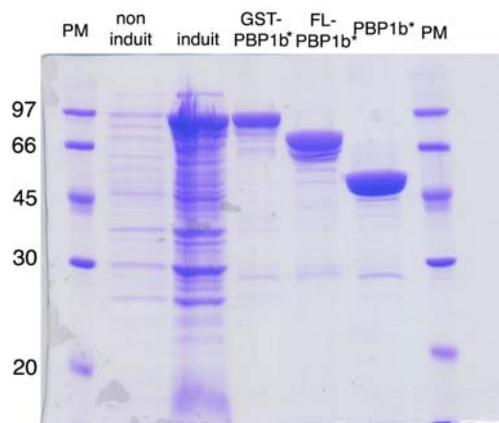


Figure 39 : Gel SDS PAGE montrant les différentes étapes de purification de PBP1b* et FL-PBP1b*.

PM correspond au marqueur de poids moléculaire. Sont représentées, les fractions non induite (non induit), induite (induit), après purification sur la colonne Gluthatione-Sépharose (GST-PBP1b*), après coupure à la protéase Tev pour extraire la protéine entière périplasmique (FL-PBP1b*) et après coupure à la protéase trypsine pour extraire le domaine transpeptidase (PBP1b*).

Les analyses en diffusion de lumière (résultats non montrés) sur PBP1b* ont montré que la protéine était monomérique et monodisperse avec une masse d'environ 52 kDa, en accord avec la masse théorique de 51412 Da. En revanche, les analyses en spectrométrie de masse dénaturante réalisée au LSMP à l'IBS ont permis de déceler une espèce majoritaire à 51414 Da pouvant correspondre au domaine transpeptidase de PBP1b* ainsi qu'une espèce minoritaire de masse égale à 53520 Da. Afin de déterminer la nature de cette espèce nous avons effectué un séquençage N-Terminal de PBP1b* par dégradation d'Edman au Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire de l'IBS. La séquence correspondant à la masse calculée de 53520 Da correspond à une coupure protéolytique après l'arginine 304. Cette nouvelle coupure protéolytique située en C-terminal du domaine glycosyltransférase ainsi que les anciennes coupures situées en N-terminal du domaine de liaison, nous ont permis d'envisager que la région de liaison entre les domaines GT et TP était extrêmement flexible, et accessible aux protéases. Nous n'avons pas envisagé de réaliser de mutation de ce nouveau site puisqu'il pourrait impliquer une nouvelle réorganisation de la région de liaison et révéler ainsi de nouveaux sites de coupure.

Le résultat de la structure cristallographique de PBP1b* présentée plus loin, nous a révélé un peptide dont la structure ne correspondait pas à celle du domaine TP et dont nous avons réussi à prédire la séquence grâce à la carte de densité électronique. Par la suite, cette séquence a été confirmée par des expériences en spectrométrie de masse en conditions natives ainsi que par le séquençage N-terminal. Ainsi, il nous est apparu qu'un petit peptide de 25 résidus, du domaine GT était resté lié au reste de la protéine et cela, malgré les étapes de purification. Les bornes réelles du peptide du domaine GT pour lequel nous avons pu tracer les résidus 105 à 119 dans la structure de PBP1b* ont été déterminées après publication (Macheboeuf *et al.*, 2005) et correspondent aux résidus 101 à 125. L'ensemble de ces résultats sont résumés dans le tableau 5 suivant, présentant les masses expérimentales déterminées en spectrométrie de masse, les masses théoriques déterminées par les programmes bioinformatiques et les bornes des séquences déterminées par séquençage N-terminal.

Masse expérimentale	Masse théorique	Séquence
51414 Da	51412,3 Da	Q ₃₂₃ DFLP→GSLP ₇₉₁
52048 Da	52046,9 Da	D ₃₁₈ YDL→GSLP ₇₉₁
53520 Da	53518,5 Da	T ₃₀₅ GAL→GSLP ₇₉₁
2701 Da	2702 Da	D ₁₀₁ ISSI→DMLR ₁₂₅

Tableau 5 : Détermination des sites de coupure dans la protéine PBP1b*

I.1.2. Cristallogénèse de PBP1b*

Cristallogénèse de PBP1b native*

Les premiers tests de cristallogénèse réalisés sur la construction FL-PBP1b-WT trypsinisée n'ont conduit qu'à des microcristaux (Figure 40A), mais ont permis de dégager un dénominateur commun dans le processus de cristallogénèse, c'est-à-dire le sulfate d'ammonium.

Nous avons ensuite concentré nos efforts sur la protéine mutante trypsinisée PBP1b*, pour laquelle nous avons utilisé la technologie de la plate-forme de cristallisation à haut débit de l'institut. Des premiers cristaux en forme d'aiguilles ont été obtenus grâce au robot dans 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1mM EDTA ; ces cristaux étaient trop petits pour poursuivre des études de cristallographie des rayons X. Nous avons ensuite réalisé l'affinement des conditions manuellement pour obtenir des cristaux en forme de plaquettes dans les conditions 50 mM HEPES pH 7, 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 M NaCl (Figure 40B). Les cristaux poussent entre 24 à 48 heures à 15°C.

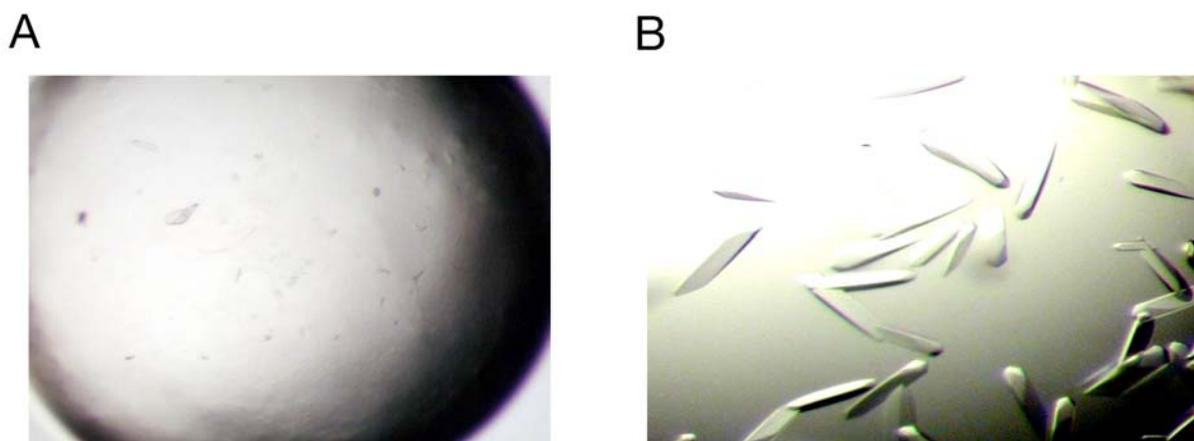


Figure 40 : essais de cristallogénèse sur les protéines PBP1b sauvage et mutante.

A : microcristaux obtenus sur le domaine transpeptidase de FL-PBP1b-WT. B : cristaux en forme de plaquettes de PBP1b*.

Ces cristaux d'environ 200 μm de longueur, 50 μm de largeur et 50 μm d'épaisseur sont ensuite plongés dans une solution cryoprotectrice contenant 20% d'éthylène glycol, puis sont congelés par immersion dans de l'azote liquide.

Production de cristaux de PBP1b sélénée*

La purification de PBP1b* sélénée a été réalisée selon le même protocole que pour la protéine native en rajoutant 10 mM de DTT dans tous les tampons de purification. Les

analyses en spectrométrie de masse ont montré qu'au terme de la purification, nous avons un adduit de 2153 Da sur la masse de PBP1b* correspondant à l'incorporation des 16 méthionines sélénées de la protéine.

Le rendement de purification représente 500 µg de protéine sélénée pour 2 L de culture et les analyses en diffusion dynamique de lumière indiquent que la protéine est monomérique.

Les cristaux sont obtenus dans 50 mM HEPES pH 7, 3,2 M NaCl, 0,8 M (NH₄)₂SO₄ et trempés dans une solution cryoprotectrice contenant 50 mM HEPES, 1 M LiSO₄, 1 M NaCl et 20% éthylène glycol.

I.1.3. Résolution de la structure de PBP1b*

Collecte des données natives

Nous avons collecté des données de diffraction sur un cristal de PBP1b* natif sur la ligne de lumière BM30A de l'ESRF. La collecte a été réalisée à une longueur d'onde $\lambda = 0,9794$ Å, indexée et intégrée avec les logiciels DENZO et SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997) jusqu'à une résolution de 1,9 Å.

Collecte des données sélénées

La collecte sur un cristal de PBP1b* sélénée a été réalisée sur la ligne BM30A de l'ESRF. Nous avons tout d'abord effectué un spectre de fluorescence sur le cristal grâce au programme Rontec afin de déterminer le seuil d'absorption du sélénium au sein de la protéine. Ce spectre est ensuite analysé à l'aide du programme CHOOCH pour extraire les longueurs d'onde correspondant au maximum de f'' , au minimum de f' et une longueur d'onde loin de ces pics qui servira de référence (Figure 41). Pour notre expérience, nous avons donc réalisé 3 collectes aux longueurs d'onde du pic : 12646,5 eV (0,9803 Å), de l'inflexion : 12644,7 eV (0,9805 Å) et de la référence : 12679,8 (0,9778 Å) (Figure 41 et Tableau 6). Pour chacun de ces jeux de données nous avons enregistré 180 images par incrémentation de 1° nous permettant d'obtenir une bonne redondance des pics de diffraction et une bonne complétude (Tableau 6).

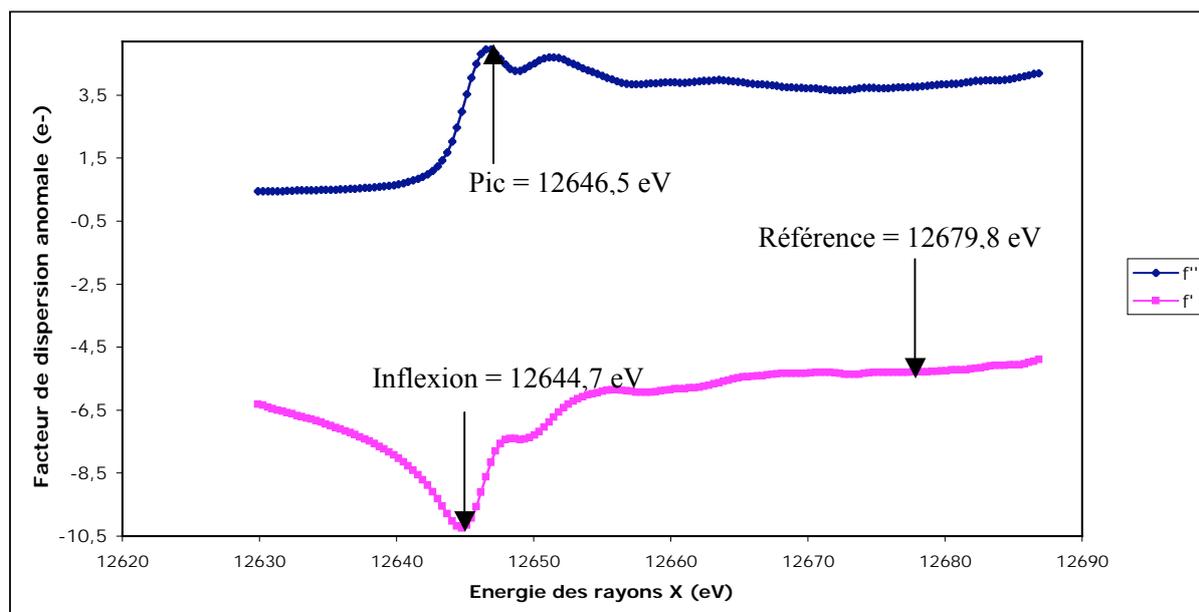


Figure 41 : Calcul des longueurs d'onde correspondant au pic d'absorption du sélénium dans la structure de PBP1b* par le programme CHOOCH.

Traitement des données

Les 3 jeux de données de PBP1b* sélénisée ainsi que le jeu de données de PBP1b* native ont été indexés séparément avec les programmes DENZO et SCALEPACK avec des statistiques résumées dans le tableau 6.

Collectes	PBP1b*	PBP1b* -SeMet (pic)	PBP1b* -SeMet (inflexion)	PBP1b* -SeMet (référence)
Groupe d'espace	C222 ₁	C222 ₁	C222 ₁	C222 ₁
Paramètre de maille (Å)				
a	98,3	98,0		
b	149,4	149,6		
c	97,9	98,0		
Longueur d'onde (Å)	0,9794	0,9803	0,9805	0,9778
Résolution (Å)	1,9	2,4	2,3	2,3
Total obs. refl.	818506	566496	566990	570547
Complétude (%)	99,9	98,3	99,9	99,9
I/σI	25,6(4,3)	21,1(5,2)	19,7(4,7)	16,9(3,9)
Rsym (%)	9,1(32,7)	4,3(18,3)	4,6(20,5)	5,5(29,2)
Redondance	7,8 (7,6)	6,6 (6,4)	6,7 (6,3)	6,6 (6,5)
Figure de mérite Après SOLVE/ Après RESOLVE	0,57/0,72			

Tableau 6 : Statistiques du traitement des jeux de données de PBP1b* native et sélénisée. Les chiffres entre parenthèses représentent les valeurs dans la dernière tranche de résolution.

La protéine native possède un volume de maille de $1437761,36 \text{ \AA}^3$. Le coefficient de Matthews à $3,4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ permet de calculer le pourcentage de solvant dans le cristal qui est de 63,7% pour une molécule dans l'unité asymétrique.

Le phasage de PBP1b* a été réalisé à partir des jeux de données de la protéine sélénée à une résolution de $2,4 \text{ \AA}$. Le programme SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) nous a permis de localiser les 16 méthionines sélénées de la protéine, puis le programme RESOLVE (Terwilliger, 1999) après aplatissement de solvant, a construit de façon automatique 85% de la chaîne peptidique.

Nous avons réalisé des étapes de reconstruction de la chaîne polyalanines sur la PBP1b* sélénée, puis effectué un remplacement moléculaire des données natives à $1,9 \text{ \AA}$ pour terminer de reconstruire la chaîne d'acides aminés. Nous avons réalisé l'affinement du modèle par des cycles successifs de minimisation d'énergie, des facteurs d'agitation thermique et de recuit simulé à l'aide du programme CNS (Brünger *et al.*, 1998) pour atteindre les statistiques présentées dans le tableau 7 ci-dessous. La structure de PBP1b* a été déposée dans la PDB sous le code 2bg1.

Affinement	Native	SeMet
Résidus	454	451
Atomes de protéine	3475	3420
Molécules d'eau	388	239
Ions	1 sulfate 1 chlore	
R _{work} (%)	20,1	23,8
R _{free} (%)	22,2	25,8
Rms Déviations		
liaisons (Å)	0,005	0,051
Angles (°)	1,19	1,20
Facteur B total(Å ²)	26,97	27,36

Tableau 7 : Statistiques d'affinement des jeux de données de PBP1b* native et sélénée.

I.1.4. Structure globale de PBP1b* (Macheboeuf *et al.*, 2005)

Nous avons pu tracer dans les cartes de densité électronique les résidus 108-110 et 337-788.

PBP1b de *S. pneumoniae* contient une courte région cytoplasmique (en noir dans la figure 42), un ancrage membranaire (en rose), le domaine GT d'environ 25 kDa (en jaune) relié au domaine transpeptidase (en bleu) à l'aide d'une région de liaison (en rouge).

Enfin, PBP1b* est terminée par une courte région C-terminale suivie par une queue poly-sérines. Le clonage de FL-PBP1b* a été réalisé de façon à éliminer les régions cytoplasmique, membranaire et poly-sérines, cette dernière supposée top flexible.

La structure de PBP1b* nous a révélé une organisation en 3 domaines avec une région N-terminale contenant le peptide du GT (en orange sur la figure 43A) et la région de liaison (en rouge). La région centrale contient le domaine transpeptidase représenté en bleu dans la figure 43A et enfin une partie C-terminale riche en brins β (en vert), dont aucune similarité structurale avec d'autres protéines n'a pu être déterminée dans les banques de données.

La partie N-terminale

Au niveau de la partie N-terminale, le peptide du GT dont les résidus 105 à 119 ont pu être tracés dans la carte de densité électronique, montre un repliement en deux brins β (β_a et β_b en orange dans la figure 43A) faisant partie d'un feuillet à 5 brins dont un brin est un membre de la région de liaison et les deux autres faisant partie du domaine TP.

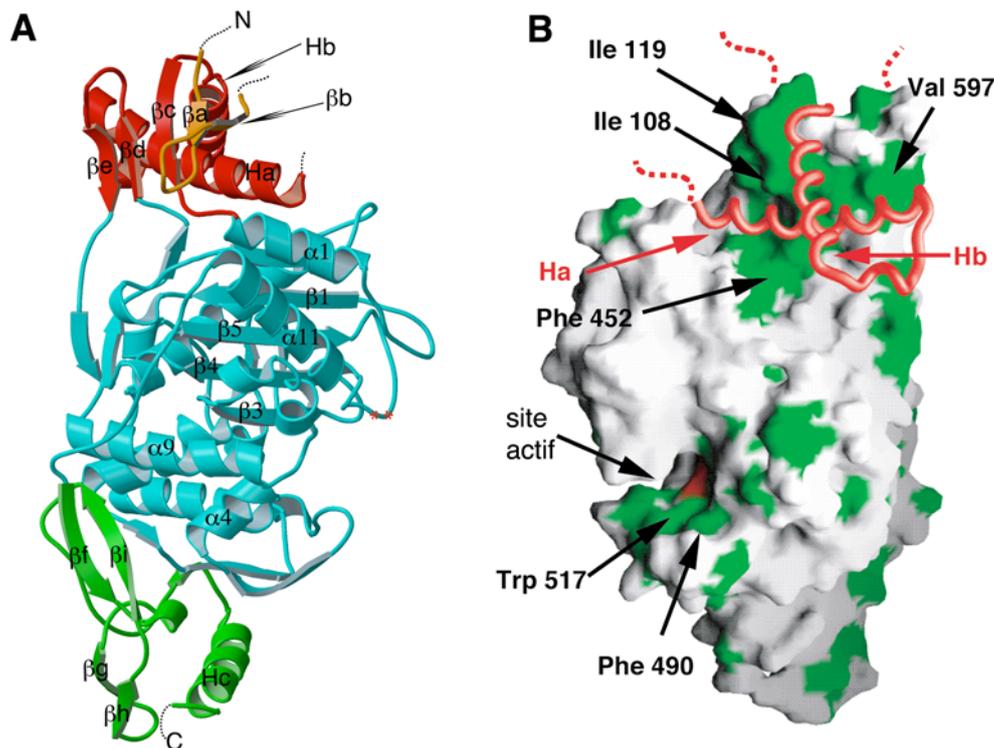


Figure 43 : Représentation tridimensionnelle de PBP1b*. A : Représentation en hélices et feuillets des trois domaines de PBP1b* montrant la partie N-terminale en rouge et orange, le domaine transpeptidase en bleu et la partie C-terminale en vert. B : Représentation en surface de la protéine montrant la région de liaison en rouge. Les résidus hydrophobes sont montrés en vert. La sérine catalytique au fond de la gorge catalytique est en rouge.

La région de liaison est composée de deux hélices perpendiculaires (Ha et Hb) séparées par une boucle. Nous avons pu remarquer que ces deux hélices étaient stabilisées au fond d'une structure hydrophobe en entonnoir (en vert dans la figure 43B) formé en particulier par les résidus Leu-426, Phe-452, Ile-586, Val-597 et Tyr-598 situés au niveau du domaine TP, et des résidus Ile-108, Val-115, Ile-116 et Ile-119 situés au niveau du GT et du domaine de liaison. L'hélice Ha, qui correspond à la partie N-terminale de la région de liaison, est particulièrement stabilisée dans la structure en entonnoir, alors que l'hélice Hb est plus exposée au solvant. Il est intéressant de noter que l'entonnoir hydrophobe n'est pas totalement recouvert par les hélices de la région de liaison et qu'il reste par conséquent des zones hydrophobes exposées au solvant. D'autre part, des résidus hydrophobes présents sur le feuillet à 5 brins et sur la partie N-terminale de l'hélice Ha sont eux aussi exposés au solvant. Ces deux observations nous ont permis de suggérer que cette région hydrophobe pouvait constituer un patch de reconnaissance pour le domaine GT N-terminal.

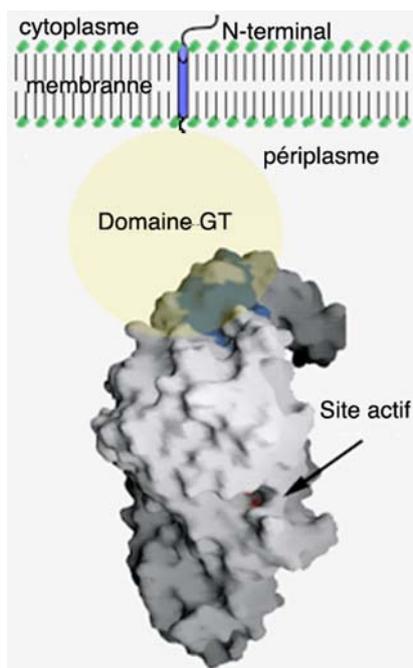


Figure 44 : Modèle de l'organisation du domaine GT en jaune, au niveau du patch hydrophobe (en bleu) formé par les résidus hydrophobes exposés au solvant de l'hélice Ha et des brins β a, β b, β c, β d, β e.

Nous avons ainsi proposé que cette région en bleu dans la figure 44 permettait d'accueillir le domaine GT (en jaune) et dont le site actif pourrait être situé sur la même face que le site actif du domaine TP (en rouge dans la figure 44). La découverte de la même organisation du domaine N-terminal chez PBP1a du pneumocoque (Contreras-Martel *et al.*, 2005) nous permet de suggérer que dans les molécules entières, les domaines GT et TP pourraient être organisés de la même façon (Figure 45). Si l'on considère que les PBP de

classe A doivent catalyser deux réactions concertées lors du processus de division cellulaire, un positionnement commun à toutes les PBP de classe A des modules GT et TP est indispensable. En effet, les réactions du cycle cellulaire doivent être organisées convenablement en présence des nombreux partenaires protéiques et des nombreux substrats présents lors de ces réorganisations.

A partir de l'arrangement de la partie N-terminale des PBP de classe A PBP1b et PBP1a du pneumocoque, on peut comparer ces structures à celles des PBP de classe B possédant une disposition similaire. En effet, on peut remarquer que la région riche en brins β des PBP de classe B en position N-terminale est relativement superposable avec les deux brins du GT des PBP de classe A. Ainsi on peut avancer que le domaine de liaison pourrait jouer le rôle de harnais entre les domaines TP d'une part et GT ou N-terminal d'autre part. La présence d'un domaine de liaison présent à la fois chez les PBP de classe A et de classe B nous permet d'avancer que soit les PBP de classe B ont évolué à partir de PBP de classe A, soit que les deux classes dérivent d'un ancêtre commun bifonctionnel dont les deux domaines étaient connectés par une région de liaison (Macheboeuf *et al.*, 2006). Les structures d'autres PBP de classe A pourraient nous permettre de répondre à cette question.

Le domaine central catalytique

La région centrale est composée du domaine transpeptidase catalytique présentant la signature classique de la superfamille des pénicilline-sérine transférases. Il est composé d'un feuillet β central formé par les brins β_3 , β_4 , β_5 , β_1 , β_2 entouré par 3 hélices (α_1 et α_{11} sur une face et α_8 sur la face opposée du feuillet) ; la numérotation des structures secondaires suit celle définie pour les β -lactamases de classe A (Lobkovsky *et al.*, 1993). Ce repliement est classique des β -lactamases et des enzymes de reconnaissance du peptidoglycane telles que des β -lactamases de classe A (Lobkovsky *et al.*, 1993), la transpeptidase soluble K15 de *Streptomyces* (Fonzé *et al.*, 1999) et des PBP de classe B (Lim and Strynadka, 2002; Parès *et al.*, 1996; Sauvage *et al.*, 2002), malgré de faibles identités de séquences (Figure 45). La superposition des carbones alphas des domaines TP de PBP1b* avec PBP2x (287 carbones alpha), K15 (182 carbones alpha) et la β -lactamase TEM1 (233 carbones alpha) montre une déviation standard de 2,9, 3,0 et 3,4 Å respectivement (Macheboeuf *et al.*, 2006).

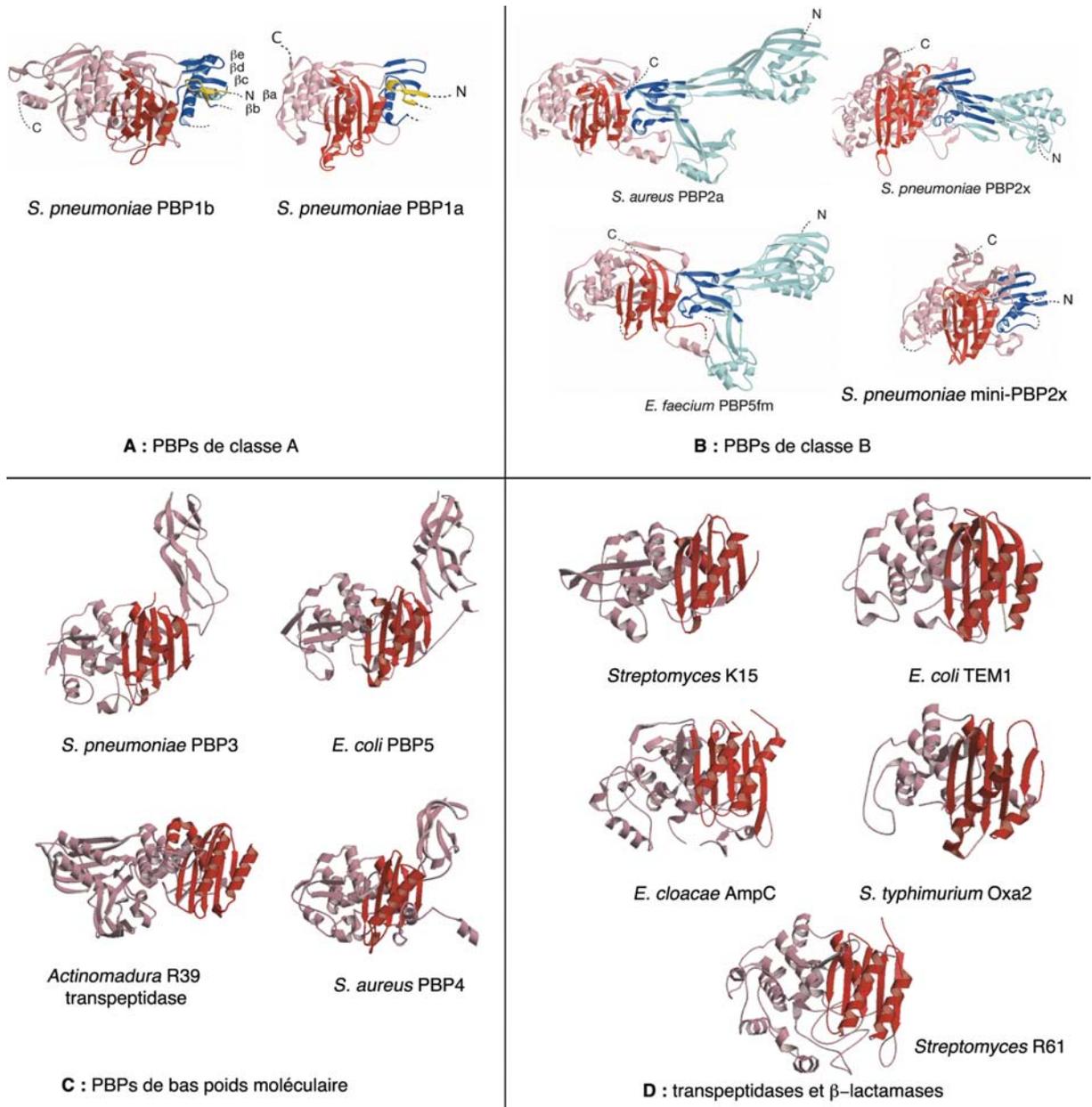


Figure 45 : Galerie de structures d'enzymes interagissant avec les β -lactamines. Elles possèdent un domaine catalytique central composé d'un feuillet à 5 brins entouré de 2 ou 3 hélices (rouge). A : La région de liaison des PBP de classe A est en bleu foncé. Le peptide du GT est montré en jaune. B : Les PBP de classe B possèdent une extension N-terminale en bleu clair. C : Les PBP de faible poids moléculaire. D : Les transpeptidases solubles et les β -lactamases (Macheboeuf *et al.*, 2006).

I.1.5. Le site actif de PBP1b* est inaccessible aux ligands

Le site actif de PBP1b* comporte les trois motifs catalytiques classiques des pénicilline-sérine transférases (figure 46B): le motif S*xxK (Ser*-460, Thr-461, Thr-462, Lys-463) portant la sérine nucléophile Ser*-460, situé au niveau de la partie N-terminale de l'hélice α_2 ; le motif SxN (Ser-516, Trp-517, Asn-518) formant la boucle entre α_4 et α_5 sur

la gauche de la cavité enzymatique et le motif KTG (Lys-651, Thr-652, Gly-653) sur le brin $\beta 3$.

Lors de l'analyse structurale du site actif de PBP1b* nous avons eu la surprise de découvrir une organisation sensiblement différente de celle des enzymes mentionnées plus haut. En effet on observe la rupture d'une liaison hydrogène entre les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ au niveau des résidus Thr-655 et Asn-660 dont la valeur : 4,64 Å permet d'affirmer que la nature anti-parallèle de ces deux brins est brisée au niveau de ces deux résidus (figure 46A). Par voie de conséquence, la chaîne latérale du résidu Asn-656 bloque l'entrée du site actif en formant une liaison hydrogène avec l'atome d'azote du résidu Ala-499 situé sur une boucle en face de $\beta 3$ (figure 46B). De plus, l'atome O_{γ} nucléophile de la sérine catalytique (Ser-460) pointe vers le brin $\beta 3$ au lieu d'interagir avec les résidus conservés de la triade catalytique (figure 46B).

Il apparaît ainsi que la gorge catalytique de PBP1b* est inaccessible à l'approche de ligand, ce qui n'avait jamais été observé dans les enzymes de reconnaissance du peptidoglycane.

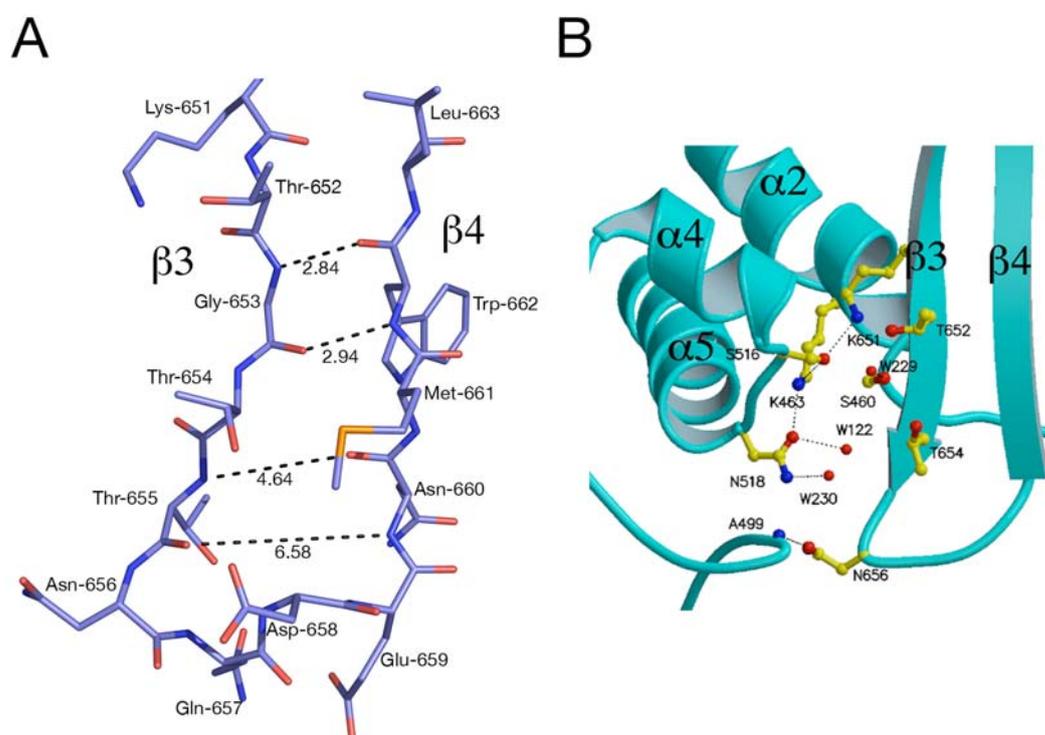


Figure 46 : Représentation du site actif de PBP1b* dans une conformation fermée. A : Représentation en bâtons des brins $\beta 3$ et $\beta 4$ avec les liaisons hydrogène stabilisatrices de la structure en feuillet. B : Représentation du site actif et des résidus qui le composent.

I.1.6. Caractérisation fonctionnelle de PBP1b*

Nous avons ensuite voulu nous assurer que la nouvelle construction PBP1b* était aussi active que la protéine sauvage et que la singularité structurale décrite précédemment n'était pas liée aux trois mutations que nous avons réalisées afin d'obtenir des cristaux. Pour cela, nous avons réalisé, avec l'aide de Marc Jamin à l'Institut de Virologie Moléculaire et Structurale de Grenoble, des expériences de mesures d'acylation des antibiotiques grâce à un spectrophotomètre couplé à un appareil de mélange rapide (stopped-flow). Les différentes constructions PBP1b*, PBP1b* entière périplasmique (FL-PBP1b*) et la forme sauvage de cette dernière construction (FL-PBP1b-WT) ont été testées en présence de céphalothine, céfotaxime, pénicilline et nitrocéfine. Les résultats présentés dans le tableau 8 indiquent qu'il y a très peu de différences entre les formes de PBP1b mutantes trypsinisées et non trypsinisées (comparer les colonnes PBP1b* et FL-PBP1b*) comme c'est le cas pour PBP1a (Di Guilmi *et al.*, 1998). Ceci peut indiquer que le domaine GT n'est pas impliqué dans la reconnaissance de l'antibiotique et que sa localisation dans l'espace n'interfère pas avec le site actif du domaine TP.

Antibiotique	PBP1b* (101-125 ; 306-791)	FL-PBP1b* (74-791)	FL-PBP1b-WT (74-791)
Céphalothine	90,8 ± 3,2	85,3 ± 3,9	253,8 ± 20,0
Céfotaxime	7,8 ± 0,4	7,0 ± 0,2	44,2 ± 1,9
Pénicilline	6,5 ± 0,3	5,0 ± 0,2	19,1 ± 1,8
Nitrocéfine	99,7 ± 10,0	ND	ND

Tableau 8 : Efficacités d'acylation (k_2/K) de différents antibiotiques pour les protéines PBP1b* et PBP1b sauvage Les valeurs de constante d'acylation sont $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. ND signifie non déterminé.

D'autre part, si on compare les formes non tronquées des protéines mutante (FL-PBP1b*) et sauvage (FL-PBP1b-WT), on s'aperçoit que la forme sauvage possède une efficacité catalytique de 2,8 à 6,3 fois plus importante que pour la protéine mutante comportant les mutations R₃₃₆Q, R₆₈₆Q et R₆₈₇Q. Les mutations R₆₈₆Q et R₆₈₇Q sont localisées sur une boucle entre le brin β 5 et l'hélice α 11 du domaine transpeptidase (astérisques rouges sur la figure 43A) et la mutation R₃₃₆Q, bien que non visible dans la structure est située en position N-terminale. Ces trois positions sont ainsi localisées à une distance supérieure à 20 Å du site actif, et ne peuvent pas interférer avec la capacité d'acylation de l'antibiotique. En

revanche, les mutations R₆₈₆Q et R₆₈₇Q sont situées en surface de la protéine et pourraient avoir un rôle de stabilisation et d'attraction de l'antibiotique entrant, chargé négativement ; ce rôle de stabilisation serait légèrement diminué dans le cas de la protéine mutante en raison de la modification des charges présentes en surface de la protéine, due à la présence des résidus glutamines.

La faible différence d'efficacité d'acylation entre les protéines mutante et sauvage nous a conduit à nous demander s'il existait des différences structurales notables entre ces deux protéines. Pour cela nous avons réalisé des expériences de dichroïsme circulaire et de calcul de température de fusion pour les constructions FL-PBP1b-WT, FL-PBP1b* et « FL-PBP1b* + céfotaxime » dans un rapport protéine/céfotaxime : 1/2. Les résultats sont présentés dans les Figure 47 et 48.

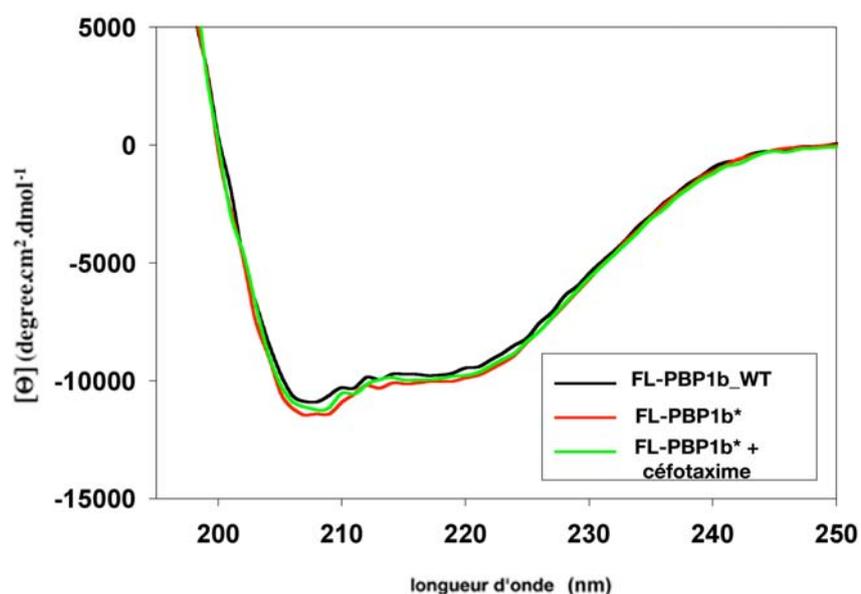


Figure 47 : Profil de dichroïsme circulaire pour les protéines FL-PBP1b-WT, FL-PBP1b* et FL-PBP1b* en présence de céfotaxime dans un rapport protéine/céfotaxime : 1/2.

L'analyse de la figure 47 montre qu'il n'y a pas de différence notable entre les trois expériences présentées, ce qui démontre qu'il n'existe pas de différence structurale majeure entre les protéines sauvage et mutante. De plus on n'observe pas de différence significative entre les courbes représentatives de la protéine FL-PBP1b* en présence ou en absence de céfotaxime.

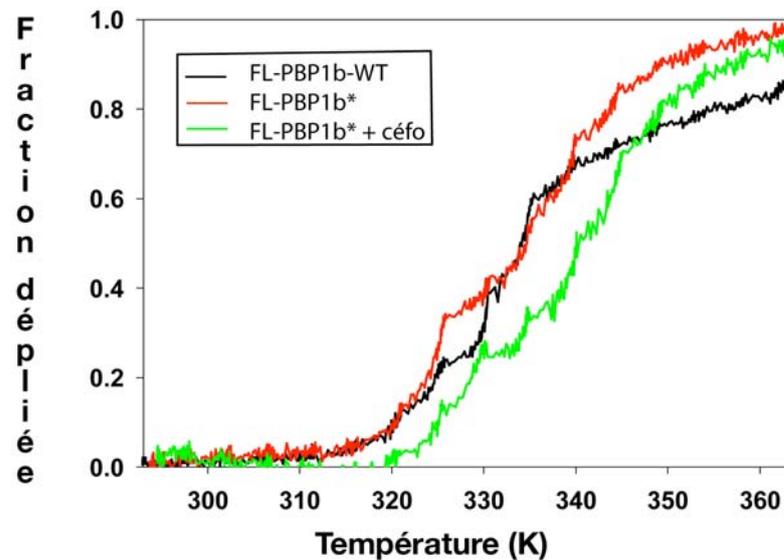


Figure 48 : Courbe de dichroïsme circulaire à 222 nm en fonction de la température exprimée en kelvin.

La figure 48 représente le profil de dénaturation des trois protéines, à partir duquel on peut extraire les températures auxquelles on observe 50% de protéine dénaturée. Cette température T_m , est caractéristique de la stabilité d'une protéine et peut être sensiblement modifiée dans le cas d'une modification par mutagenèse ou par l'accroche d'un ligand. Dans notre cas, les T_m pour FL-PBP1b-WT et FL-PBP1b* sont égales à 333 K, soit 60°C et PBP1b* en complexe avec la céfotaxime possède un T_m de 340 K, soit 67°C. Ces résultats indiquent que les protéines mutante et sauvage ont une stabilité identique en fonction de la température. De plus, la faible variation de T_m entre la protéine non complexée et complexée n'indique qu'un faible gain de stabilité en présence d'antibiotique, celui-ci pouvant masquer certaines zones instables de la protéine.

Ces expériences nous ont permis de montrer que la protéine mutante PBP1b* ne subissait pas de changements structuraux pouvant expliquer la forme fermée de la protéine cristallisée en comparaison de la protéine sauvage.

I.2. Structure de PBP1b* en complexe avec un pseudo-substrat de la réaction

Les premiers tests de trempage des cristaux natifs en présence d'antibiotique ont abouti, soit à la dégradation des cristaux au point de les détruire, soit à des structures identiques à la structure native, en conformation fermée, sans antibiotique au sein de la cavité enzymatique. Nous avons ensuite envisagé de réaliser des cocrystallisations entre PBP1b* et un pseudo-substrat thiolester, le S2d, connu pour être un substrat de la transpeptidation *in vitro* (Adam *et al.*, 1991).

L'avantage de ce pseudo-substrat est que sa structure tridimensionnelle mime l'avant dernière alanine du substrat naturel (encadré rouge dans la figure 49), que la dernière alanine est mimée structurellement par le groupement thiol (encadré noir sur la figure 49) ; le groupement phényle représente ensuite le reste de la chaîne pentapeptidique du substrat naturel.

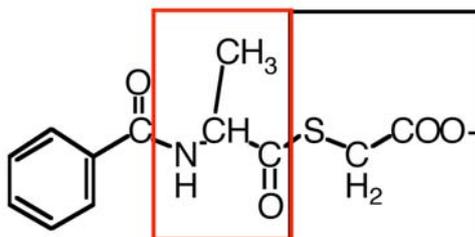


Figure 49 : Formule chimique de la molécule S2d. Le cadre rouge délimite une D-alanine, le cadre en noir le groupement thiol qui mimerait la dernière alanine du pentapeptide du peptidoglycane.

La plupart des cocristaux PBP1b*-S2d dont nous avons résolu la structure possédaient une conformation fermée. En revanche, tous ces cocristaux préalablement lavés puis retrempés dans des solutions d'antibiotique, présentaient des sites actifs en position ouverte comportant une liaison covalente entre la sérine active de PBP1b* et l'antibiotique (voir chapitre II).

I.2.1. Structure de l'intermédiaire réactionnel entre PBP1b* et S2d

Nous avons collecté 18 jeux de données sur les cristaux cocrystallisés avec 5 mM de S2d, c'est-à-dire avec un excès de 20 fois la concentration en protéine. Parmi ces 18 jeux, nous avons obtenu un jeu de données exploitable, possédant une densité covalente sur la sérine active 460 dans les cartes différence Fourier $F_o - F_c$ et $2F_o - F_c$. Les statistiques correspondant à ce jeu de données sont présentées dans le tableau 9.

Collecte	PBP1b*-S2d
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètre de maille (Å)	
A	96,8
B	101,1
C	145
Longueur d'onde (Å)	0,979
Résolution (Å)	2,5
Complétude (%)	99,9
Rsym (%)	5,2 (22,3)
Redondance	5,2 (4,7)

Tableau 9 : Statistiques du traitement du jeu de données PBP1b*-S2d.

Cette structure de PBP1b*-S2d a été résolue par remplacement moléculaire à l'aide du programme AMORE (Navaza, 2001) en prenant pour modèle la structure native de PBP1b* à 1,9 Å et en omettant les résidus de la cavité enzymatique présents sur les brins β 3 et β 4 ainsi que ceux présents sur les boucles α 2, α 4 et α 5 pour ne pas biaiser le modèle. La solution nous donnait 2 molécules dans l'unité asymétrique, dans le groupe d'espace P2₁2₁2₁, que nous avons affinées avec les programmes CNS puis Refmac5 de la suite CCP4 (CCP4, 1994) en l'absence de ligand, par des cycles successifs d'affinement des facteurs B, de minimisation d'énergie et de recuit simulé. Les paramètres d'affinement de la structure sont présentés dans le tableau 10.

Affinement	PBP1b*-S2d
Résidus	943
Atomes de protéine	7291
Molécules d'eau	251
Ions	2 sulfates 2 chlores
R _{work} (%)	18,1
R _{free} (%)	23,3
Rms Déviations	
liaisons (Å)	0,025
Angles (°)	2,181
Facteur B total (Å ²)	32,7
Facteur B du ligand (Å ²) (mol A/ mol B)	33,3 / 37,5
Occupation (mol A/ mol B) (%)	100 / 84

Tableau 10 : Statistiques d'affinement du jeu de données PBP1b*-S2d.

La première observation importante sur cette structure, est que la gorge catalytique est positionnée dans une conformation ouverte. En effet, la liaison entre les résidus Thr-655 et Asn-660 est remplacée à distance raisonnable pour une liaison hydrogène, c'est-à-dire 3,06 Å entre les atomes O du résidu 660 et N du résidu 655, au lieu de 4,64 Å pour la forme fermée (Figure 46A). La liaison entre les atomes O de Thr-655 et N de Asn-660 reste à une distance supérieure par rapport à la liaison hydrogène classique, mais se rapproche un peu pour se retrouver à 5,18 Å, au lieu de 6,58 Å dans la structure native (Figure 50A). Globalement, le brin $\beta 3$ reprend sa conformation antiparallèle avec $\beta 4$ sur toute sa longueur, permettant au résidu Asn-656 de se repositionner sur la partie droite de la cavité enzymatique et d'ouvrir la gorge pour l'accommodation de ligand (Figure 50B).

De plus, la formation du complexe covalent permet à la sérine active d'occuper le rotamère classique des PBP, c'est-à-dire que l'atome d'oxygène γ pointe de nouveau vers les résidus des motifs catalytiques (SxN) et (S*xxK), au lieu de pointer vers le brin $\beta 3$ comme décrit précédemment dans la structure native.

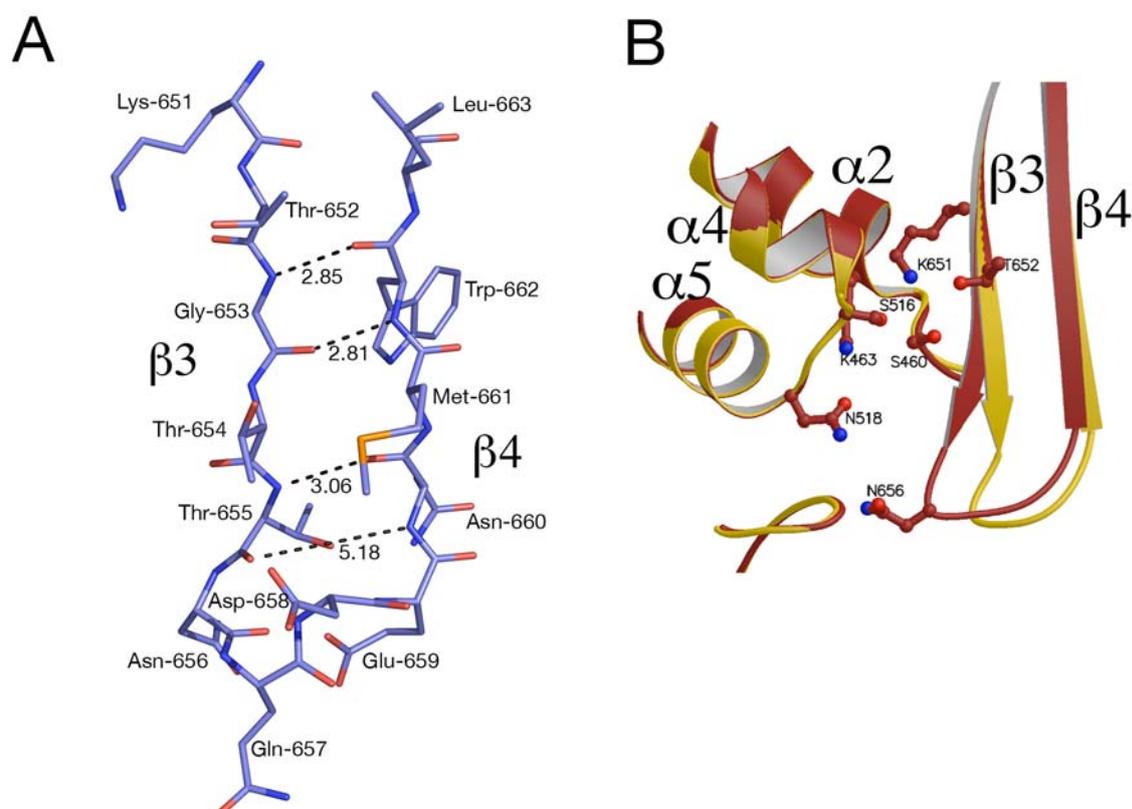


Figure 50 : A : Représentation en bâtons des brins $\beta 3$ et $\beta 4$ avec les liaisons hydrogène et leurs valeurs entre ces deux brins. B : Superposition des sites actifs des structures natives (en rouge) et complexée avec le S2d (en jaune), montrant l'ouverture du site actif au niveau du brin $\beta 3$.

Les différences entre les structures native et complexée avec le S2d sont indépendantes de l'empilement cristallin, différent entre les deux structures.

Nous avons ensuite construit dans la carte différence Fourier Fo-Fc une partie de la molécule S2d en liaison covalente avec la sérine active 460, partie qui correspond au groupement phényle et D-alanine du S2d. Le groupement phényle n'a pu être rajouté que dans la deuxième molécule de l'unité asymétrique, avec une occupation de 50% par rapport au reste de la molécule. Malgré cela, le cycle benzénique n'est pas très bien défini dans la carte de différence Fourier 2Fo-Fc puisqu'il est probablement très agité dans la gorge (Figure 51A) en raison de l'absence de contact avec des résidus adjacents (Figure 51B).

La figure 51B montre les interactions entre le ligand S2d lié de façon covalente à la sérine active et les résidus qui le stabilisent. On constate que la partie correspondant au groupement D-alanine, la plus proche de la sérine 460, est stabilisée par les résidus conservés de la gorge catalytique, à la fois par des liaisons hydrogène (grâce à la sérine 516 du motif SxN, la thréonine 654 suivant le motif KTG et la thréonine 652 du motif KTG) et par des contacts hydrophobes. En revanche, le cycle benzénique n'est stabilisé par aucune liaison, pouvant éventuellement lui permettre une certaine mobilité au sein de la cavité enzymatique (Figure 51B).

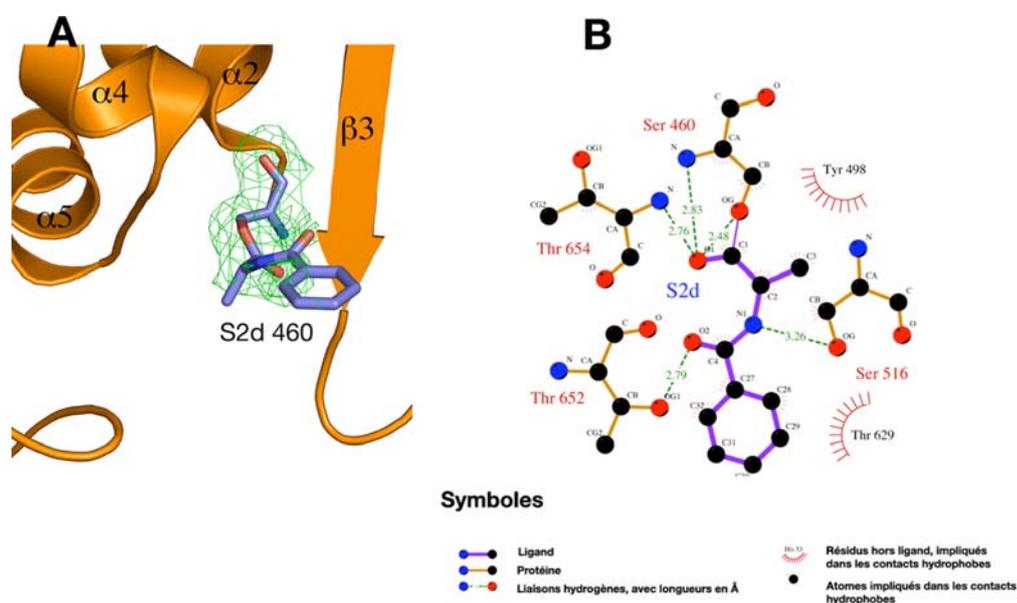


Figure 51 : Représentation schématique du S2d dans la structure de PBP1b*

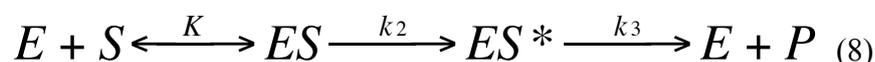
A : Représentation du site actif du complexe PBP1b*-S2d. Une carte différence Fourier Fo-Fc à 2.5σ est centrée sur la sérine catalytique 460, avant l'introduction du S2d dans les affinements. B : Figure préparée avec le programme Ligplot montrant les interactions entre le S2d et les résidus stabilisateurs.

I.2.2. Caractérisation fonctionnelle de l'étape d'acylation par le S2d

Les données structurales concernant le complexe PBP1B*-S2d n'étant pas complètes en raison de l'absence du cycle benzénique dans les cartes de densité électronique, nous n'étions pas certains de la nature du ligand au sein de la structure cristallographique. Nous avons donc entrepris une étude de caractérisation fonctionnelle de la protéine avec le S2d pour vérifier et expliquer la présence de cette molécule dans le site actif.

Caractérisation de l'efficacité d'acylation

Le mécanisme d'acylation des PBP suit un schéma cinétique simple présenté dans l'équation (8) ci-dessous :



L'étape d'acylation des PBP avec un substrat ou un antibiotique est une étape rapide caractérisée par la constante K de dissociation du complexe non covalent ES et la constante k_2 d'acylation du complexe covalent ES*. L'étape de désacylation est considérée comme une étape lente et est caractérisée par la constante k_3 de dissociation du complexe covalent ES*.

Les paramètres les plus couramment déterminés sont les valeurs d'acylation de la protéine par des antibiotiques de type β -lactamine qui possèdent des vitesses de désacylation extrêmement lentes et qui de ce fait, ne sont pas de bons modèles pour la caractérisation fonctionnelle de ces enzymes. Les travaux de (Adam *et al.*, 1990; Jamin *et al.*, 1993) sur la découverte de substrats thiolesters ont permis de mettre à notre disposition des outils nous permettant de caractériser la véritable fonction enzymatique des PBP, c'est-à-dire l'hydrolyse de la liaison entre les résidus D-alanine-D-alanine et la transpeptidation entre deux pentapeptides du peptidoglycane. En particulier le S2d permet de visualiser spectroscopiquement la formation du complexe acyl-enzyme en fonction du temps. Ceci est réalisé soit par la mesure directe de l'hydrolyse de la liaison thiolester du S2d absorbant à 250 nm, soit en mesurant la décroissance de la fluorescence intrinsèque de la protéine cible en fonction de l'addition du substrat. Nous avons testé les deux méthodes pour essayer de déterminer les constantes cinétiques d'hydrolyse du S2d, mais seule la méthode de décroissance de fluorescence de PBP1b* a donné des résultats exploitables.

La mesure de la décroissance de la fluorescence intrinsèque de la protéine est réalisée lorsqu'un tryptophane proche de la cavité enzymatique, voit son environnement protéique proche modifié, changeant ainsi ses capacités de fluorescence. En effet, la collision d'un fluorophore excité (dans notre cas un tryptophane) avec d'autres molécules, dissipe l'excès d'énergie de ce fluorophore excité et l'intensité de la fluorescence diminue. On parle alors d'atténuation ou de quenching de fluorescence.

Les mesures d'atténuation de fluorescence sur la formation du complexe non covalent ES ne peuvent pas être déterminées probablement parce que le phénomène d'atténuation de la fluorescence résulte de la formation de la liaison covalente entre la sérine active et le substrat (Mouz, 1999). Nous avons donc mesuré l'efficacité d'acylation par la mesure de la constante k_2/K grâce à des mesures d'atténuation de la fluorescence intrinsèque de PBP1b* au cours du temps à l'aide d'un spectrofluorimètre couplé à un mélangeur rapide (Frère *et al.*, 1975; Jamin *et al.*, 1991; Nieto *et al.*, 1973).

Ces résultats présentés dans le tableau 11 montrent tout d'abord qu'on observe un signal de décroissance de fluorescence, directement lié à l'acylation de la sérine active de l'enzyme. La valeur d'efficacité d'acylation du S2d, de $249.3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est en accord avec les valeurs déterminées pour les autres PBP du pneumocoque, avec cependant une valeur relativement basse en comparaison de celle de PBP2x.

	Kcat/Km ($\text{M}^{-1} \text{S}^{-1}$)	références
<i>Streptomyces</i> R61	700000	(Jamin <i>et al.</i> , 1991)
<i>E.coli</i> PBP3	100	(Adam <i>et al.</i> , 1997)
<i>S. pneumoniae</i> PBP2b	300	(Adam <i>et al.</i> , 1991)
<i>S. pneumoniae</i> PBP2x	2500	(Mouz <i>et al.</i> , 1999)
<i>S. pneumoniae</i> PBP1a	128	(Di Guilmi <i>et al.</i> , 1998)
<i>S. pneumoniae</i> PBP1b*	249.3	Ce manuscrit
<i>E. hirae</i> PBP1d	1600	(Adam <i>et al.</i> , 1991)
<i>E. hirae</i> PBP3	3200	(Adam <i>et al.</i> , 1991)

Tableau 11 : Valeurs des efficacités d'acylation du S2d pour différentes PBP de différents organismes.

Dans un deuxième temps, ces valeurs tant pour PBP1b* que pour les autres PBP, montrent que ce substrat thiolester n'est pas un substrat très efficace pour ces enzymes. En revanche il est très efficace en ce qui concerne la transpeptidase soluble de *Streptomyces* R61 pour laquelle l'efficacité catalytique est 200 fois supérieure à celle de la PBP la plus efficace (*E. hirae* PBP3) et près de 3000 fois supérieure à celle de PBP1b*. Une des hypothèses avancée dans l'introduction au paragraphe III.2.2.1, serait que ces substrats solubles sont efficaces sur des protéines solubles comme R61 mais que les PBP, qui sont des protéines

membranaires requièrent soit des substrats membranaires pour lesquels elles ont beaucoup plus d'affinité, soit des partenaires protéiques leur permettant de s'associer en un complexe multiprotéique (Anderson *et al.*, 2003).

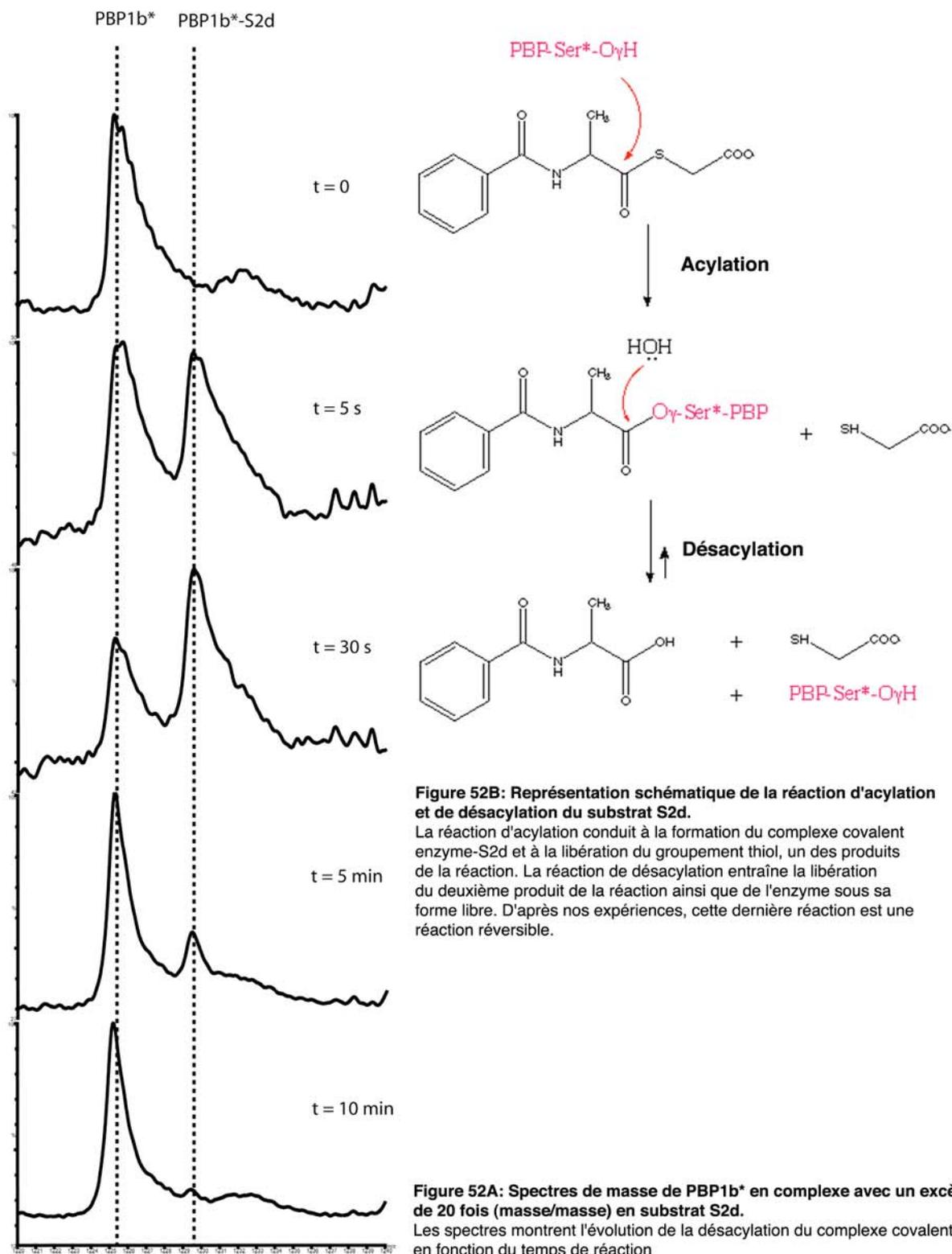
Malgré le fait que ce substrat soit peu efficace, il faut tout de même noter que la réaction d'acylation, même en présence d'un large excès de S2d, est terminée en quelques secondes. Il est donc difficile dans ce cas, d'expliquer comment nous avons pu piéger un intermédiaire de la réaction d'hydrolyse puisque nous avons réalisé des cocristaux sur 48 heures, temps pendant lequel la réaction d'hydrolyse est largement terminée. Nous pouvons supposer que si nous avons réalisé une expérience de trempage des cristaux dans une solution concentrée de S2d, nous aurions pu expliquer le mécanisme de piégeage de l'intermédiaire par un contrôle du temps de trempage correspondant à l'échelle de temps de la réaction d'acylation.

Dans l'espoir de comprendre quel phénomène nous a mené à cet intermédiaire cristallographique, nous avons voulu caractériser plus avant l'étape de désacylation du complexe covalent de la réaction.

I.2.3. Caractérisation fonctionnelle de l'étape de désacylation

Pour cela, nous avons réalisé des expériences en spectrométrie de masse en conditions dénaturantes et en temps résolu.

A juste titre, nous pensions que le temps de vie du complexe covalent PBP1b*-S2d était éphémère et que la désacylation de ce complexe était irréversible comme indiqué dans l'équation (8). Nous nous sommes tout d'abord placé dans des conditions de concentration en enzyme et substrat identiques à celles utilisées pendant la cristallogénèse, c'est-à-dire un excès de 20 fois (masse/masse) en substrat par rapport à PBP1b*. Ensuite, la réaction d'acylation est arrêtée en milieu acide toutes les cinq secondes et enfin les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes par électrospray. La figure 52A montre les résultats des mesures aux temps $t = 0$, $t = 5$ secondes, $t = 30$ secondes, $t = 5$ minutes et $t = 10$ minutes, temps auquel la réaction est terminée puisque la courbe obtenue à $t = 10$ minutes n'évolue plus, même après 3 heures de réaction.



La figure 52A nous montre l'apparition d'un pic possédant un adduit de 175 ± 1 Da au bout du temps de réaction le plus faible, c'est-à-dire 5 secondes. La réaction prédite d'acylation du S2d par PBP1b* (Figure 52B) implique l'adduit covalent d'une molécule de

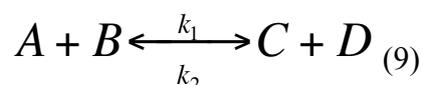
175 Da, ce qui est la preuve que PBP1b* est capable d'hydrolyser le S2d et qu'il y a accumulation du complexe acyl-enzyme en solution.

Au bout de 5 secondes, les proportions entre l'enzyme libre et la forme PBP1B*-S2d sont environ de 50% pour chacune des formes de la protéine, puis après 30 secondes l'enzyme liée compte pour environ 60 % des molécules de la solution. Après 5 minutes de réaction, les proportions s'inversent pour obtenir environ 90% d'enzyme libre et 10% d'enzyme complexée. Entre les temps réactionnels de 30 secondes et 5 minutes, la réaction de désacylation se met en place pour être complètement terminée au bout de 10 minutes de réaction. En effet, le même spectre que celui obtenu après 10 minutes de réaction a été obtenu après 3 heures (non montré).

La première conclusion que l'on peut tirer en analysant cette Figure 52A, est que le temps de désacylation (de l'ordre de la minute) est certes plus lent que le temps d'acylation (de l'ordre de la seconde), mais tout de même rapide si l'on compare à la gamme de temps utilisée lors des expériences de cristallogénèse (48 heures).

En revanche, le dernier spectre de la Figure 52A correspondant au temps réactionnel de 10 minutes, montre une très faible proportion d'enzyme complexée, toujours présente sur le spectre correspondant à 3 heures de réaction (spectre non montré). Cette observation indique que la réaction de désacylation est une réaction réversible, et non pas irréversible comme nous le pensions (Figure 52B).

En effet, la loi d'action de masse stipule que la vitesse d'une réaction est proportionnelle aux concentrations de chacun des réactants. Si l'on considère la réaction (9) suivante :



Les vitesses de formation et de dissociation des produits sont :

$$V_1 = k_1 \cdot [A] \cdot [B]$$

$$V_2 = k_2 \cdot [C] \cdot [D]$$

Cette loi stipule que lorsque les vitesses de réaction sont égales, on atteint un équilibre avec la définition de la constante d'équilibre K de la réaction :

$$K = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$$

On peut ainsi facilement comprendre que lorsqu'on se trouve en excès de substrat, comme c'est notre cas en présence de 5 mM de S2d au cours de la réaction d'hydrolyse, la réaction est alors fortement déplacée vers la formation des produits, avec une constante V_1 bien supérieure à V_2 . Cependant, la réaction étant soumise à un équilibre, il peut arriver que les produits et les réactifs coexistent, ce qui nous amène à garder présente une partie de complexe covalent, qu'il nous a été possible d'isoler.

I.2.4. Caractérisation de la transpeptidation sur PBP1b*

Nous avons ensuite voulu déterminer si PBP1b* était une transpeptidase active, c'est-à-dire si elle était capable de réaliser une transpeptidation entre un substrat et un accepteur ; dans tous les cas, le S2d fait office de substrat.

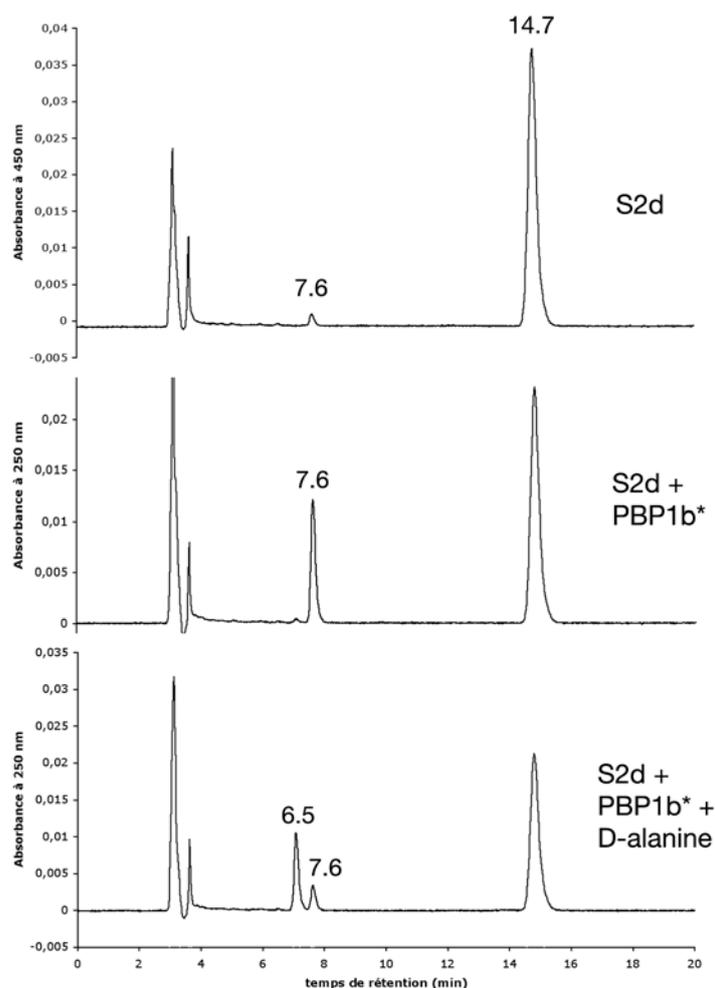


Figure 53 : Caractérisation de la transpeptidation entre le S2d et la D-alanine pour FL-PBP1b* par HPLC. Le temps de rétention est indiqué au-dessus de chaque pic.

Nous avons utilisé différents acides aminés comme accepteurs potentiels et toutes les injections sur HPLC ont été réalisées après un même temps de réaction de 5 minutes. Les produits de la réaction sont ensuite analysés par HPLC avec une détection à 250 nm.

La figure 53 montre en première ligne, l'injection du S2d à 100 μ M. Les pics ayant un temps de rétention inférieurs à 5 minutes correspondent à l'injection. Le pic principal à 14.7 minutes correspond à la molécule de S2d non hydrolysé et le pic mineur à 7.6 minutes correspond à une très faible partie de S2d hydrolysé et en particulier à la partie N-benzoyl-D-alanine ; l'acide thioglycolique n'absorbant pas à cette longueur d'onde. Lorsque nous rajoutons l'enzyme à 20 μ M, on observe une diminution du pic principal à 14.7 minutes et la poussée du pic d'hydrolyse à 7.6 minutes. PBP1b* est donc capable d'hydrolyser le S2d, ce que nous avons déjà montré par ailleurs. Lorsque nous ajoutons au mélange précédent un accepteur tel que la D-alanine, nous observons une baisse sensible de l'intensité des pics correspondant au S2d libre et hydrolysé. En revanche, nous voyons apparaître un nouveau pic à 6.5 minutes, correspondant au produit de transpeptidation de la réaction entre le N-benzoyl-D-alanine du S2d et la D-alanine acceptrice. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'accepteur N-acétyl-L-lysine-D-alanine-D-alanine, mais pas avec la L-lysine seule.

PBP1b* est donc active et capable de réaliser des réactions d'hydrolyse et de transpeptidation en prenant comme substrat donneur le S2d. La nature des trois substrats accepteurs testés est en accord avec les accepteurs présents au niveau du pentapeptide du peptidoglycane du pneumocoque. En effet, la transpeptidation dans la cellule s'effectue entre le tétrapeptide « L-alanine- γ -D-glutamate-L-lysine-D-alanine » et le pentapeptide « L-alanine- γ -D-glutamate-L-lysine-D-alanine-D-alanine » avec le départ de la dernière alanine. Le fait que la transpeptidation n'ait pas lieu en présence de L-lysine seule, permet de montrer qu'une ou deux D-alanines sont donc indispensables pour réaliser une transpeptidation chez PBP1b*.

I.2.5. Comment avons-nous pu piéger l'intermédiaire réactionnel ?

Comme nous venons de le montrer plus haut, les réactions d'acylation et de désacylation sont des réactions rapides dont l'échelle de temps est en désaccord avec celle de la cristallogénèse. En revanche, les expériences de spectrométrie de masse ont montré que la réaction de désacylation, supposée irréversible en raison de sa vitesse supérieure à celle de la ré-acylation du complexe, était en réalité une réaction réversible. Elle est certes, fortement déplacée vers la formation des produits de la réaction, mais on ne peut pas exclure qu'il existe

une faible part de cette réaction qui soit réversible nous permettant d'assister à l'accumulation d'une faible quantité de complexe covalent.

La figure ci-dessous (Figure 54) montre une expérience pendant laquelle nous avons réalisé l'hydrolyse du S2d en présence et en absence d'un des produits de la réaction : le N-benzoyl-D-alanine.

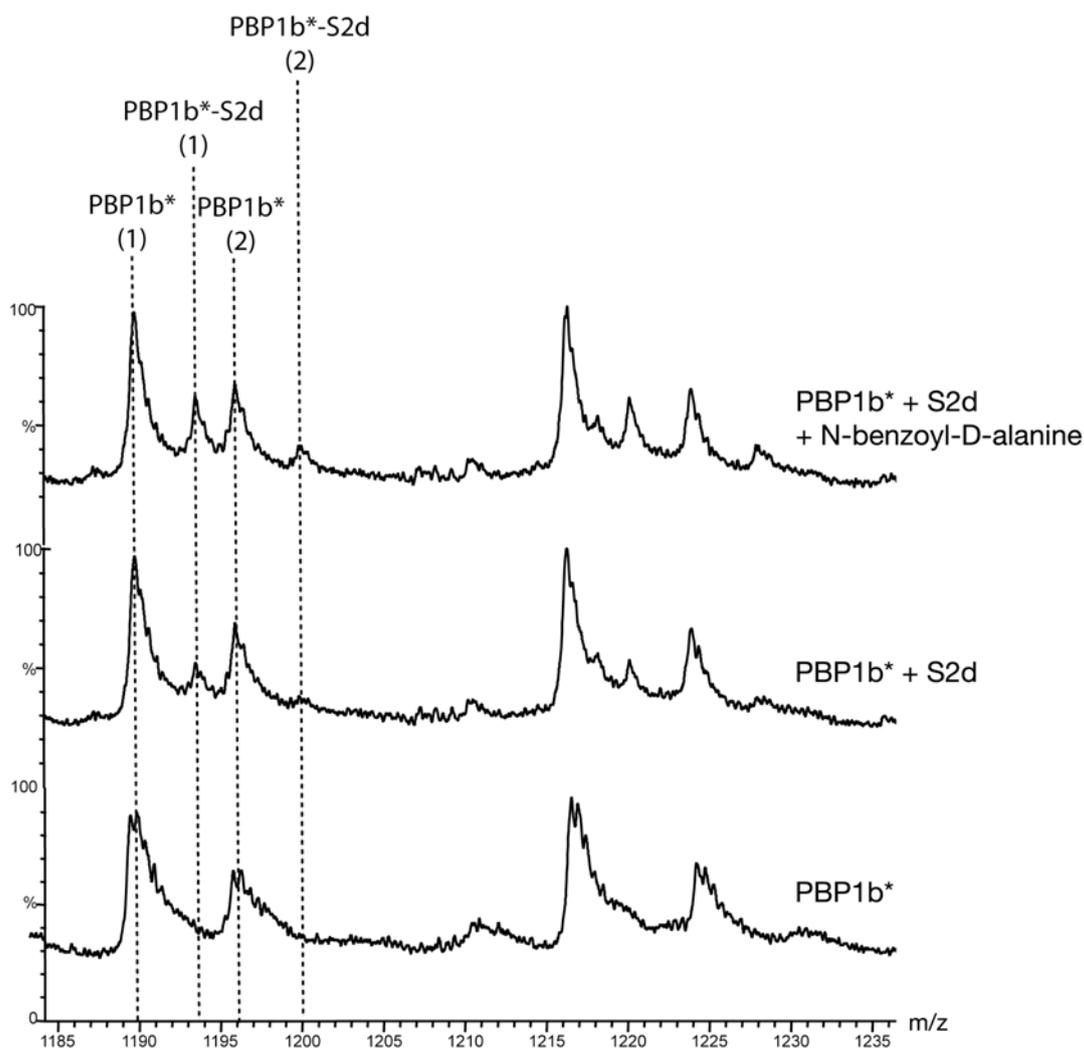


Figure 54 : Spectres de masses montrant l'acylation de PBP1b* par le S2d en absence ou en présence d'un des produits de la réaction : le N-benzoyl-D-alanine. La réaction est bloquée à $t = 5$ min. les deux parties du spectre correspondent à deux états de charge différents.

Dans cette expérience PBP1b* possède une coupure interne au niveau du résidu Thr-305 impliquant la présence de deux espèces de la protéine, de masse 51414 Da (PBP1b*(1)) et 53520 Da (PBP1b*(2)); ces deux espèces réagissent de la même façon à l'acylation par le S2d. Lorsqu'on arrête la réaction d'hydrolyse du S2d en milieu acide au bout de 5 minutes de réaction, on observe la majorité des molécules dans leur état libre et une faible partie des molécules dans un état complexé avec le S2d, comme montré dans la figure 52A au temps de

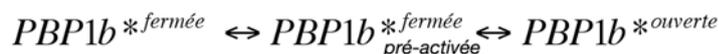
réaction de 10 minutes. On remarque que l'ajout du N-benzoyl-D-alanine, produit de la réaction, permet d'obtenir une plus grande quantité de protéine complexée, pour les deux espèces de PBP1b*, ce qui confirme notre hypothèse de réversibilité de la réaction de désacylation du complexe covalent. En effet, d'après la loi d'action de masse, en augmentant la quantité de produit de la réaction, on peut déplacer d'autant cette réaction vers la formation du complexe covalent.

Lors de l'étape de cristallogenèse, PBP1b* existe à la fois dans une conformation libre, comptant pour la majorité des molécules de la solution ainsi que dans une conformation correspondant à la forme acylée de l'enzyme, comptant pour une faible part des molécules. La technique de cristallisation est une méthode de purification puisqu'au cours de ce processus, des molécules identiques s'associent entre elles pour former un réseau tridimensionnel parfait. Ainsi, dans notre solution contenant à la fois une forme libre et une forme complexée de PBP1b*, les points de nucléation sélectionnent la protéine selon sa conformation, nous permettant d'obtenir quelques cristaux de protéine complexée parmi une majorité de cristaux de PBP1b* dans la conformation libre.

De façon similaire, une étude récente sur les changements de conformations de la protéine cytochrome c peroxidase (CCP), montre que les formes ouvertes inactives et fermées actives de la CCP sont en équilibre constant en solution, même en absence de ligand. L'utilisation d'un ligand qui sélectionne la forme fermée de la protéine, permet de déplacer l'équilibre d'ouverture-fermeture vers la forme fermée active (Cao et al., 2006). La proportion entre les protéines ouvertes et fermées est de 10 :1 en absence de ligand et de 1 :10 lors de l'accroche du ligand, ce qui a permis de sélectionner par cristallogenèse, les formes ouvertes en absence de ligand et fermées en présence du ligand.

I.2.6. Discussion sur la dynamique de PBP1b*

Dans le cas de la CCP, les molécules sont en équilibre permanent et l'introduction du ligand ne fait que déplacer cet équilibre d'une forme vers l'autre. Dans notre cas, il apparaît important de discuter de la dynamique de la protéine à travers les différentes conformations étudiées en cristallographie et présentées dans le schéma suivant. Les pourcentages sont représentatifs du nombre de structures résolues dans les différentes conformations présentées dans le schéma.



Sans ligand :	100%	0%	0%
Avec S2d :	0%	94.5%	5.5%

Les expériences de trempages des cristaux natifs dans des solutions d'antibiotiques n'ayant abouti qu'à des échecs et à une forme fermée de la protéine, nous avons conclu que PBP1b* dans sa forme apoenzyme existait uniquement dans une conformation fermée.

La cocrystallisation avec un excès de S2d a permis d'isoler deux nouvelles conformations de la protéine : une forme fermée pré-activée ainsi qu'une forme ouverte. En effet, la majorité des cocristaux PBP1b*-S2d sur lesquels nous avons collecté des jeux de données, possédaient un site catalytique dans une conformation fermée. En revanche, la majorité de ces cocristaux préalablement lavés dans une solution de liqueur mère puis retrempés dans une solution d'antibiotique (de type nitrocéfine ou céfotaxime) possèdent un site actif en conformation ouverte et complexé avec ce même antibiotique. Ainsi, bien que la gorge catalytique de ces cocristaux soit dans une conformation fermée, elle semble pré activée par son contact avec le substrat, lui permettant d'effectuer un changement conformationnel dans le cristal pour accommoder un antibiotique.

Enfin, dans 1 cas sur 18, nous avons pu isoler une forme ouverte de la protéine, complexée avec une molécule de S2d, correspondant à la forme ouverte activée de la protéine.

A partir de ces différents jeux de données structurales, nous avons pu mettre en évidence une dynamique structurale de PBP1b* en fonction de son interaction avec un pseudo-substrat de la réaction de transpeptidation, sans lequel elle ne peut pas être activée.

On peut maintenant se demander si cette molécule thiolester est la seule molécule permettant l'activation de PBP1B*, puisque les antibiotiques de type pénicilline ou céphalosporine possèdent également une structure tridimensionnelle mimant la liaison entre les deux dernières alanines du substrat naturel de la transpeptidation. Il est concevable que ces molécules d'antibiotique possèdent les même caractéristiques d'activation de PBP1b* que le S2d, mais les essais de cocrystallisation de la protéine avec des antibiotiques ont toujours échoué, ne nous permettant pas de conclure sur la capacité d'activation de ces inhibiteurs.

Il est à noter que récemment, un groupe canadien a résolu la structure de PBP1b de *S. pneumoniae* non muté, contenant le domaine transpeptidase dont le site catalytique est en position ouverte en l'absence de substrat (Lovering *et al.*, 2006). Dans ce cas, la sérine catalytique ainsi que les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ se superposent parfaitement avec notre structure ouverte en complexe avec le S2d. Les auteurs suggèrent que les deux conformations ouvertes et fermées de l'enzyme seraient présentes en équilibre en solution, la conformation ouverte pouvant être stabilisée par l'interaction avec d'autres protéines. Dans leur cas comme dans le nôtre, ces modifications structurales ne sont en aucun cas induites par les différences d'empilement cristallin entre les différents cristaux. En revanche, compte tenu que les auteurs n'ont obtenu qu'un seul cristal exploitable, ayant poussé au bout de plusieurs mois, on ne peut pas exclure que la protéine ait subi des modifications structurales irréversibles dues au phénomène de vieillissement, ce qui pourrait expliquer la présence de cette conformation ouverte unique.

I.2.7. Dynamique de PBP1b* dans la cellule

A partir des résultats présentés plus haut, nous avons pu proposer un modèle dans lequel les PBP pourraient exister dans une forme fermée, dans les phases de latence de la synthèse du peptidoglycane bactérien. Lorsque leur participation devient indispensable lors du cycle de division cellulaire, les PBP deviennent activées soit en interagissant avec des partenaires protéiques, soit par reconnaissance du substrat de la réaction, c'est-à-dire le peptidoglycane (Macheboeuf *et al.*, 2005) (Figure 55).

Cette dernière hypothèse est supportée par des expériences *in vivo*, en particulier sur PBP2 de *S. aureus* qui n'est capable de se localiser au niveau du septum qu'en présence de son substrat et ainsi participer activement au mécanisme de division. En effet, lorsque le site actif de PBP2 est bloqué par la présence d'un antibiotique, ou bien si le peptidoglycane est modifié chimiquement, la protéine n'est plus capable de se localiser au site de division et se localise sur toute la surface de la bactérie (Pinho and Errington, 2005).

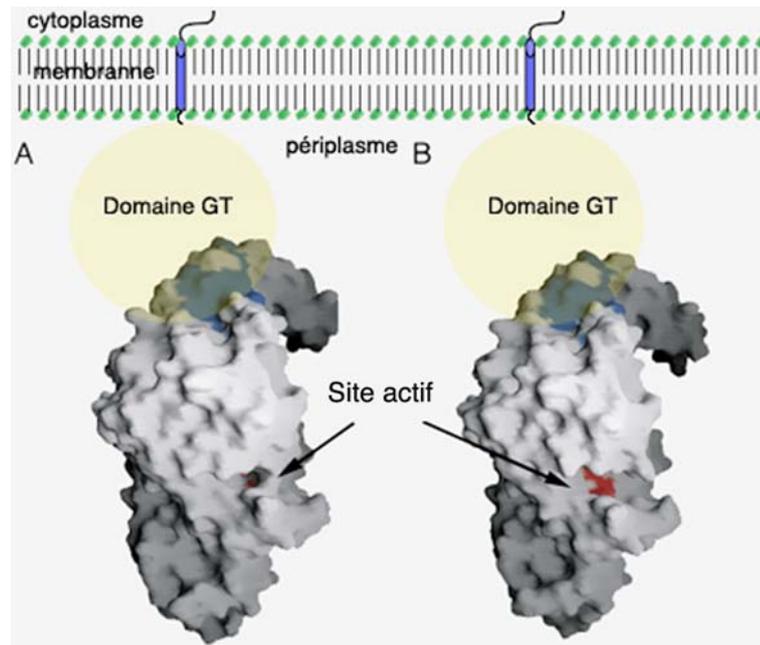


Figure 55 : Représentation en surface de PBP1b* dans les conformations ouvertes et fermées. A : Dans la conformation fermée, le site actif est bloqué et inaccessible pour accommoder un ligand. B : L'ouverture du site catalytique révèle une gorge allongée avec le site actif (en rouge) au fond. Le patch hydrophobe, exposé en surface de la protéine (en bleu) et susceptible d'accueillir le domaine GT (en jaune).

De plus, une étude sur PBP3 d'*E. coli* a montré que cette protéine possédait une vitesse d'acylation des antibiotiques bien plus rapide dans les phases de la division cellulaire que pendant les phases de latence, suggérant que le domaine transpeptidase pourrait être activé pendant l'étape de septation de la bactérie (Eberhardt *et al.*, 2003).

A partir de ces expériences *in vivo* et structurales, on peut concevoir que les PBP existent à la fois dans des conformations ouverte et fermée dans la cellule, dont la dynamique dépend de l'accessibilité des PBP au substrat et de sa localisation.

II. Complexes de PBP1b* avec des inhibiteurs, implication dans la synthèse de nouvelles molécules (Macheboeuf *et al.*, 2005)

Comme indiqué plus haut, la cocrystallisation de PBP1b* avec le S2d nous a permis d'obtenir des cristaux de PBP1b* avec un site actif ouvert, capable d'accueillir différents inhibiteurs. Ces cristaux sont préalablement lavés dans une goutte de solution de cristallisation puis retremés dans des solutions d'inhibiteurs.

II.1. Complexes PBP1b* avec la nitrocéfine et la céfotaxime

Résolution de la structure

Dans un premier temps, la nature des complexes est caractérisée en spectrométrie de masse dénaturante montrant une augmentation de masse sur la protéine en fonction des inhibiteurs utilisés. L'incubation de PBP1b* en présence de nitrocéfine, dans un rapport 1/1 (molarité/molarité) entraîne une augmentation immédiate de la masse de la protéine de $516,8 \pm 3$ Da, correspondant à la masse attendue lors d'une acylation covalente par cet inhibiteur. Par la même méthode nous déterminons la désacylation du complexe covalent en suivant le retour de PBP1b* sous sa forme apo enzyme. Pour la nitrocéfine, la désacylation totale du complexe est réalisée au bout de 1h30. Dans le cas de la céfotaxime, on assiste à une augmentation de masse de 398 Da, correspondant à la masse calculée pour une acylation totale par l'inhibiteur. En revanche, la désacylation du complexe est extrêmement lente et est supérieure à 96 heures.

Les jeux de données de PBP1b* en complexe avec la nitrocéfine et la céfotaxime ont été indexés et intégrés par le programme XDS (Kabsch, 1993). Le phasage a été réalisé par remplacement moléculaire grâce au programme AMORE en prenant comme modèle la structure native de PBP1b* à 1,9 Å et en omettant les résidus de la cavité enzymatique présents sur les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ ainsi que les résidus conservés Ser-460, Ser-516, Trp-517-Asn-518, pour ne pas biaiser le modèle. Les statistiques des jeux de données collectés sur BM30A pour la nitrocéfine et sur ID14-EH2 pour la céfotaxime, sont présentées dans le tableau 11.

collectes	PBP1b*-nitrocéfine	PBP1b*-céfotaxime
Lignes de lumière	BM30	ID14-eh2
Groupe d'espace	C222 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètres de maille (Å)		
a	97,5	96,6
b	149,3	102,3
c	98,0	146,5
Longueur d'onde (Å)	0,9790	0,9330
Résolution (Å)	2,4	3,0
Nombre total d'observations	538765	499091
Complétude (%)	99,9	100
I/σI	25,6(4,8)	8,9(2,7)
Redondance	6,3 (5,5)	6,0 (5,2)
Rsym (%)	7(31,5)	7(25,4)

Tableau 11 : Statistiques de traitement des jeux de données PBP1b*-nitrocéfine et PBP1b*-céfotaxime

L'affinement des structures a été réalisé par des cycles successifs d'affinement dans l'espace réciproque par les logiciels CNS et REFMAC5 et de modélisation manuelle dans l'espace réel grâce au logiciel COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Les affinements ont consisté en plusieurs cycles de minimisation énergétique, de minimisation des facteurs d'agitation thermique et de recuit simulé.

Les inhibiteurs dont les coordonnées ont été extraites de la Protein Data Bank (PDB) à partir des structures de PBP2a de *S. aureus* sont ensuite insérés dans la structure au niveau de la sérine active. Le positionnement des inhibiteurs en liaison covalente avec la sérine 460 est ensuite optimisé à la fois dans l'espace réel puis par minimisation dans l'espace réciproque grâce aux programmes présentés ci-dessus. Les statistiques correspondant à l'affinement des jeux de données sont présentées dans le tableau 12. Les structures ont été déposées dans la PDB sous les codes 2bg3 et 2bg4 pour la nitrocéfine et la céfotaxime respectivement.

Affinement	Nitrocéfine	Céfotaxime
Résidus	455	919
Atomes de protéine	3571	6977
Molécules d'eau	256	167
Ions	1 sulfate 2 chlores	2 sulfates 1 chlore
R _{work} (%)	20,2	19,3
R _{free} (%)	23,9	25,5
Rms Déviations		
Liaisons (Å)	0,010	0,006
Angles (°)	1,65	1,25
B global (Å ²)	33,43	37,83
B du ligand (Å ²)	59,20	45,56
Occupation (%)	92	100

Tableau 12 : Statistiques d'affinement des jeux de données PBP1b*-nitrocéfine et PBP1b*-céfotaxime

Analyse des complexes

Les structures de PBP1b* en complexe avec la nitrocéfine et la céfotaxime montrent une liaison covalente entre ces composés et l'oxygène O γ de la sérine active 460 de PBP1b*. Suite à la formation du complexe covalent, la sérine 460 adopte le rotamère classique indiquée pour le complexe PBP1b*-S2d, c'est-à-dire que l'oxygène O γ pointe vers les résidus des motifs conservés. Dans les deux structures, les atomes d'azote de la chaîne principale des résidus Ser-460 et Thr-654 forment le trou de l'oxyanion conservé. Le groupement carboxylate de la nitrocéfine (Figure 56A) est stabilisé par l'atome O γ de la Thr-652 ainsi que par une molécule d'eau. L'atome O γ de la Ser-516 forme une liaison hydrogène avec le groupement azoté du cycle lactame. De plus, le groupement R1 de la nitrocéfine (Figure 56B) est stabilisé entre les résidus Asn-656 et Asn-518 ainsi que par des contacts de van der Waals avec les résidus de la boucle 496-500 (à gauche de la cavité dans la Figure 56A), stabilisant la partie gauche de la cavité.

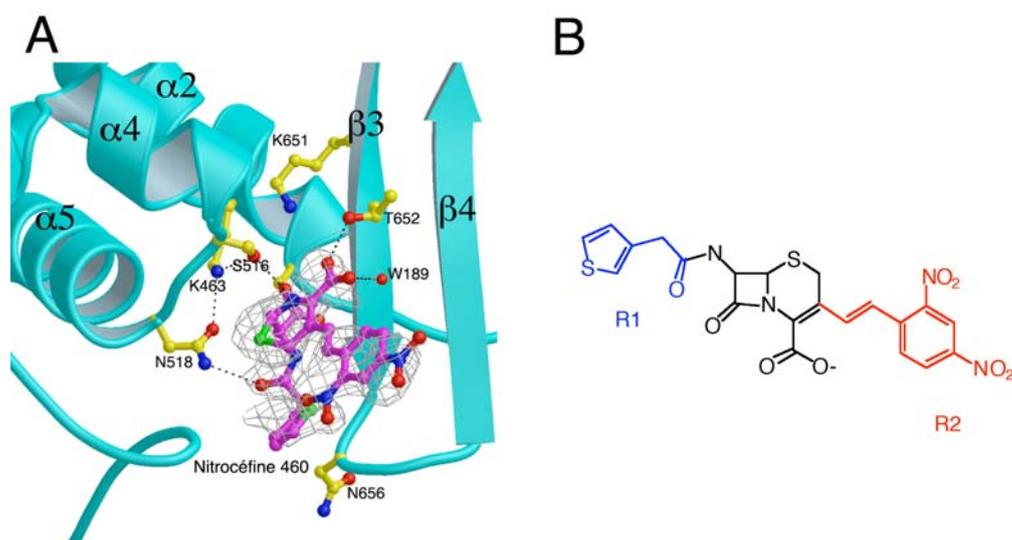


Figure 56 : A : Représentation du site actif de PBP1b* en complexe avec la nitrocéfine. Une carte Fo-Fc avant l'introduction du ligand est représentée à 2,3 σ . B : Structure chimique de la nitrocéfine.

Lors de l'acylation par la céfotaxime le groupement R2 est relâché pour être remplacé par un groupement exométhyl (CH_2), bien moins volumineux que celui de la nitrocéfine (Figure 57B). Le groupement carboxylate sur le cycle β -lactame est stabilisé grâce à une liaison hydrogène avec les résidus Thr-652 et Thr-654 ; de plus, le groupement carbonyle de la chaîne latérale R1 est stabilisé par le résidu Asn-518 (Figure 57A).

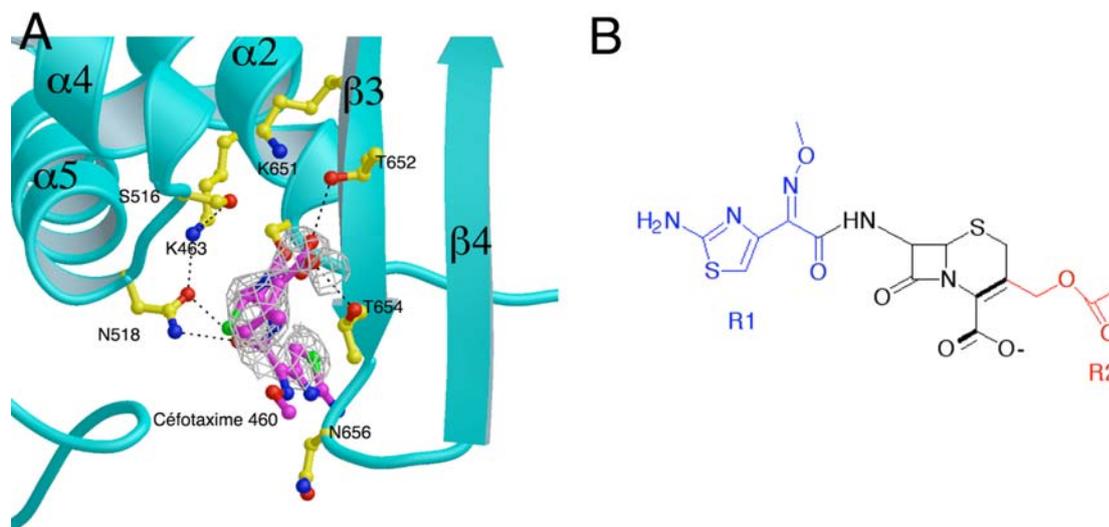


Figure 57 : A : Représentation du site actif de PBP1b* en complexe avec la céfotaxime. Une carte Fo-Fc avant l'introduction du ligand est représentée à 1,4 Å. B : Structure chimique de la céfotaxime.

Ces deux inhibiteurs sont donc capables d'accéder à la sérine catalytique malgré leurs différences structurales au niveau des groupements R2 : large et hydrophile pour la nitrocéfine et plus petit pour la céfotaxime.

De façon générale, les deux structures de complexes possèdent un site actif dans une position ouverte avec les brins $\beta 3$ et $\beta 4$ dans une conformation antiparallèle (Figure 56A et 57A).

II.2. Complexes de PBP1b* avec des composés β -lactames mimant le peptidoglycane

Caractérisation structurale

Nous avons initié une collaboration avec Rex Pratt de l'Université Wesleyan, Middletown, CT (USA) pour réaliser des expériences de trempages des cristaux de PBP1b* avec des composés de type pénicilline et céphalosporine modifiées, c'est-à-dire possédant un groupement acétyl-lysine au niveau de leurs groupements R1. Ces composés possédant une longue queue lysine ont été synthétisés dans l'espoir de maximiser les contacts au niveau de la gorge catalytique et ainsi créer des antibiotiques plus adaptés à la gorge catalytique des PBP ; ces composés sont présentés ci-dessous :

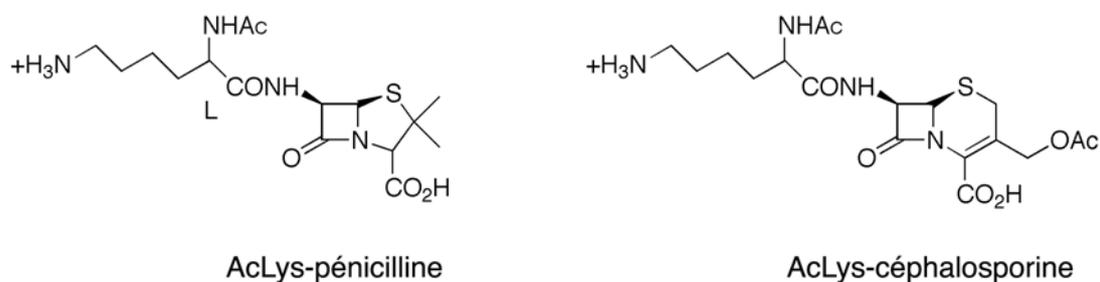


Figure 58 : Schéma des molécules chimiques Acétyl-Lysine-pénicilline et Acétyl-Lysine-céphalosporine.

Puisque nous étions en présence de nouveaux composés, nous avons tout d'abord voulu vérifier s'ils étaient susceptibles d'acyler PBP1b*. Nous avons donc réalisé des expériences en spectrométrie de masse en conditions dénaturantes pour confirmer l'acylation et déterminer si le complexe acyl-enzyme était stable en solution. Les expériences d'acylation ont été réalisées dans un rapport protéine/inhibiteur : 1/4 (molarité/molarité) et on observe au bout de quelques secondes de réaction, un adduit de 387 Da et 384 Da pour les composés AcLys-pénicilline et AcLys-céphalosporine respectivement, ce qui correspond aux masses attendues pour les complexes acyl-enzymes. La stabilité de ces complexes est déterminée de façon qualitative en réalisant des complexes protéine/inhibiteur : 1/1 (molarité/molarité). Dans ces conditions, l'acylation quasi-immédiate par l'AcLys-pénicilline n'est réalisée qu'à 60% et le complexe ne subit aucune évolution au bout de 3 heures. Dans le cas de l'AcLys-céphalosporine, l'acylation compte pour 40% des molécules et le complexe ne subit aucune désacylation au bout de 3 heures. Ces premiers résultats montrent que ces nouvelles

molécules sont susceptibles d'être utilisées comme inhibiteurs et que le complexe stable qu'elles forment avec PBP1b* nous permet d'envisager des expériences de cristallographie.

collectes	PBP1b*- AcLys- pénicilline	PBP1b*- AcLys- céphalosporine
Ligne de lumière	ID14-eh3	ID29
Groupe d'espace	C222 ₁	C222 ₁
Paramètres de maille (Å)		
a	97,60	100,1
b	149,20	151,7
c	98,12	98,6
Longueur d'onde (Å)	0,931	0,9756
Résolution (Å)	2,1	2,5
Nombre total d'observations	298616	114104
Complétude (%)	99	88,2
I/ σ I	13,12 (5,24)	13,37 (4,98)
Redondance	4,9 (3,1)	5,0 (3,0)
Rsym (%)	7,5 (32,5)	8 (31,5)

Tableau 13 : Statistiques de traitement des jeux de données PBP1b*-AcLys-pénicilline et PBP1b*-AcLys-céphalosporine.

Les expériences de trempages de nos cocristaux PBP1b*-S2d, préalablement lavés du S2d restant, ont été réalisées dans les conditions similaires à celles utilisées pour les complexes avec la nitrocéfine et la céfotaxime. Les deux jeux de données ont été indexés puis intégrés par le programme XDS. Les statistiques des jeux de données sont présentées dans le tableau 13 ci-dessus.

Le phasage par remplacement moléculaire grâce au programme AMORE a ensuite été réalisé selon la même procédure que celle décrite précédemment pour les complexes PBP1b*-nitrocéfine et PBP1b*-céfotaxime. Les molécules AcLys-pénicilline et AcLys-céphalosporine étant de nouveaux composés, leurs coordonnées ne sont pas présentes dans la PDB. Il nous a donc fallu créer pour chaque composé une bibliothèque de liaisons, d'angles et de stéréochimie décrivant les molécules dans l'espace, ceci pour pouvoir ensuite réaliser l'affinement. Cette tâche a été effectuée grâce au programme Monomer Library Sketcher de la suite CCP4.

L'affinement des modèles ainsi obtenus est ensuite réalisé grâce au programme REFMAC5 et les statistiques obtenues sont présentées dans le tableau 14.

Affinement	PBP1b*- AcLys-pénicilline	PBP1b*- AcLys-céphalosporine
Résidus	466	466
Atomes de protéine	3712	3640
Molécules d'eau	444	157
Ions	1 chlore 2 sulfates	
R _{work} (%)	16,78	22,62
R _{free} (%)	21,98	28,49
Rms Déviations		
Liaisons (Å)	0,027	0,031
Angles (°)	2,09	2,77
B global (Å ²)	29,42	48,62
B du ligand (Å ²)	32,3	42,9
Occupation (%)	100	50

Tableau 14 : Statistiques d'affinement des jeux de données PBP1b*-AcLys-pénicilline et PBP1b*-AcLys-céphalosporine.

Le complexe covalent de PBP1b* avec l'AcLys-pénicilline au niveau de la sérine catalytique 460 (Figure 59A) montre des interactions de type liaisons hydrogène avec les résidus conservés impliqués dans les liaisons classiques des inhibiteurs nitrocéfine et céfotaxime (Figure 59B).

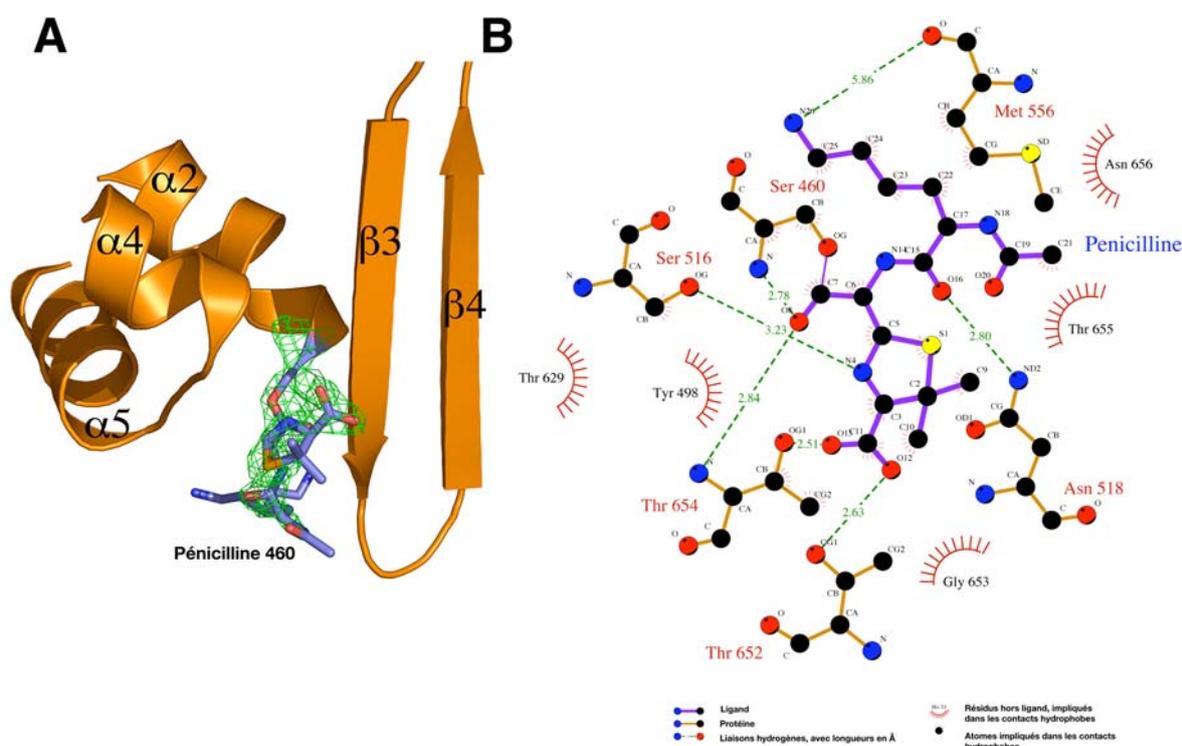


Figure 59 : Représentation schématique de l'AcLys-pénicilline dans la structure de PBP1b*

A : Carte différence Fourier $F_o - F_c$ à $2,5 \sigma$ centrée sur la sérine catalytique 460, avant l'introduction du composé dans les affinements. B : Figure préparée avec le programme Ligplot montrant les interactions entre la pénicilline et les résidus stabilisateurs.

Ce composé modifié comporte une chaîne principale qui se superpose à celle de la céfotaxime et un groupement lysine acétylée qui se superpose avec le groupement R1 de ce même antibiotique. Les atomes d'azote des résidus Ser-460 et Thr-654 forment le trou de l'oxyanion de la même façon que dans les complexes PBP1b*-nitrocéfine et PBP1b*-céfotaxime. Dans notre structure, le groupement lysine censé stabiliser la cavité possède deux conformations (Figure 59A) dont une seule est représentée sur la Figure 59B. Il semble donc, que cette longue queue lysine soit capable d'induire une certaine flexibilité en ce qui concerne ce ligand.

Le complexe covalent de PBP1b* avec le composé AcLys-céphalosporine au niveau de la sérine catalytique 460 (Figure 60A) montre des interactions de type liaisons hydrogène avec les résidus conservés de la cavité enzymatique (Figure 60B). La chaîne carbonée principale se superpose parfaitement avec celle du complexe précédent. Le groupement lysine censé stabiliser la cavité par de nouvelles interactions, ne réalise aucune interaction spécifique avec les acides aminés de la cavité. Comme indiqué précédemment, il semble que cette queue lysine ne soit pas un élément stabilisateur de l'inhibiteur mais au contraire soit susceptible d'induire une flexibilité de la molécule..

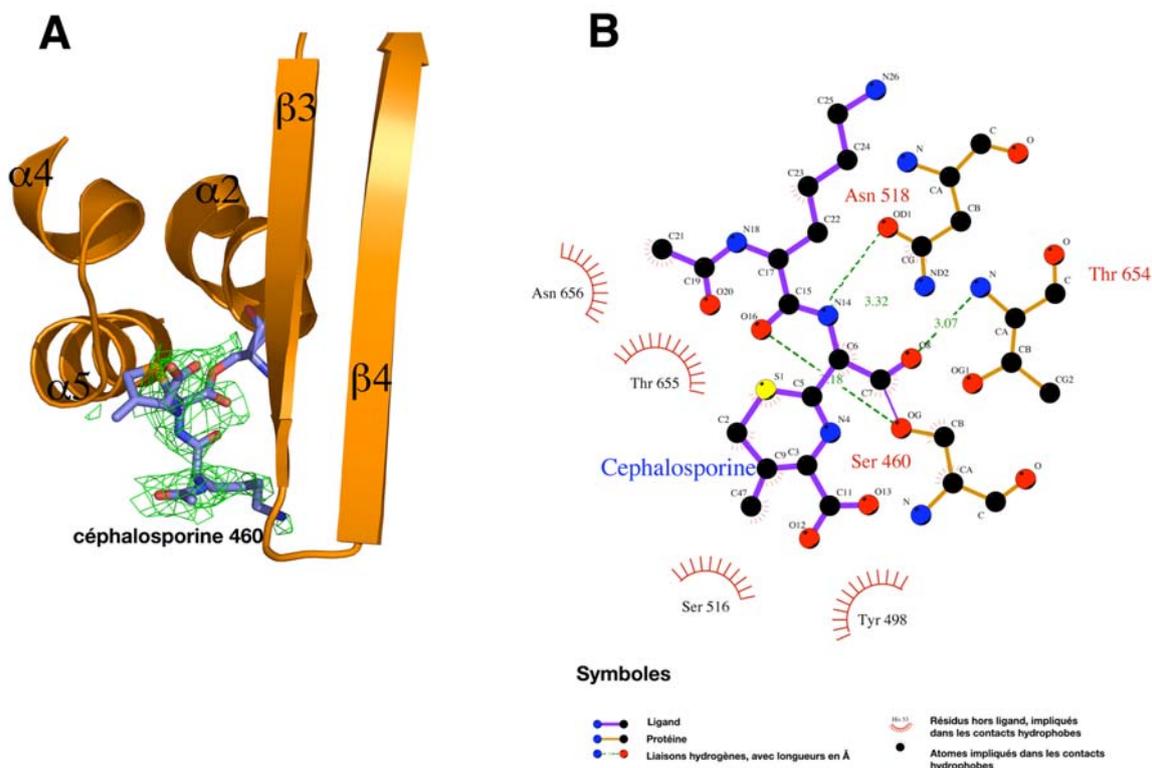


Figure 60 : Représentation schématique de l'AcLys-céphalosporine dans la structure de PBP1b*
 A : Carte différence Fourier Fo-Fc à 2,0 σ centrée sur la sérine catalytique 460, avant l'introduction du composé dans les affinements. B : Figure préparée avec le programme Ligplot montrant les interactions entre la céphalosporine et les résidus stabilisateurs.

Caractérisation enzymatique

Des mesures d'efficacité d'acylation ont été réalisées dans le laboratoire de Rex Pratt sur la protéine FL-PBP1b* dont les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

T (°C)	β -Lactamine	k_2/K ($s^{-1}M^{-1}$)
25	Benzyl-pénicilline	1300
	AcLys-pénicilline	95
	AcLys-céphalosporine	35
37	Benzyl-pénicilline	3580
	AcLys-penicilline	314

Tableau 15 : Mesures des efficacités d'acylation par les composés benzyl-pénicilline, AcLys-pénicilline et AcLys-céphalosporine par PBP1b*.

La première remarque sur ces valeurs d'acylation concerne l'acylation par la benzylpénicilline dont la valeur d'efficacité d'acylation est divisée par 1,3 par rapport à la valeur que nous avons calculée sur la même protéine (tableau 8). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la protéine envoyée par transporteur est arrivée décongelée. En effet, celle-ci pourrait avoir été partiellement endommagée, voire partiellement dénaturée.

Dans un deuxième temps, on remarque une diminution de l'efficacité d'acylation entre la benzylpénicilline et l'AcLys-pénicilline d'un facteur 11, encore plus prononcée pour l'AcLys-céphalosporine. L'acylation plus faible par les nouveaux composés pourrait trouver une explication dans l'analyse des structures cristallographiques. En effet, le groupement lysine ne semble pas améliorer la stabilisation du composé dans la gorge, mais au contraire semble augmenter sa flexibilité comme nous pouvons le remarquer par l'apparition du groupement lysine en double conformation dans la structure de PBP1b en complexe avec l'AcLys-pénicilline (Figure 59A).

La différence d'efficacité d'acylation mesurée à 25°C entre l'AcLys-pénicilline et l'AcLys-céphalosporine d'un facteur 2,7 pourraient être expliquée par le nombre plus faible de liaisons hydrogène dans le cas de la céphalosporine, impliquant une moins bonne stabilisation du composé dans le site catalytique de l'enzyme. Il reste tout de même hasardeux de vouloir expliquer des résultats de cinétique à partir de structures cristallographiques à des résolutions comprises entre 2 et 2,5 Å et dont les taux d'occupation ne sont pas de 100%. De plus, les structures des complexes covalents que nous avons obtenues ne montrent que les complexes covalents acyl-enzymes et pas les étapes de formation des intermédiaires tétrahédriques (Figure 16). En effet, l'étape de formation du premier intermédiaire

tétrahédrique est une étape décisive dans la reconnaissance de l'inhibiteur au sein de la cavité enzymatique, étape qui n'a jamais été décrite en ce qui concerne les PBP.

Il semble tout de même que ces composés ne soient pas adaptés à une bonne inhibition des PBP, malgré qu'ils soient très efficaces chez les transpeptidases solubles, en particulier chez R39 d'*Actinomadura* (Rex Pratt, papier sous presse).

II.3. Des nouvelles molécules de type γ -lactame, un espoir pour la conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs

L'apparition des souches de bactéries résistantes aux β -lactamines ainsi que l'inefficacité des nouveaux composés de type β -lactame face à ces souches, ont conduit à l'élaboration de composés cycliques à 5 membres de type γ -lactame contrairement aux cycles à 4 membres des β -lactamines (Figure 61). Les premières synthèses de composés de type γ -lactame ont été réalisées dans les années 1950 (Du Vigneaud and Carpenter, 1949) tandis que les premières études biologiques et d'inhibition de ces composés n'ont débuté que dans les années 1980.

En utilisant des techniques de criblage, une équipe japonaise a isolé à partir de cultures des bactéries *Empedobacter lactamgenus* YK-258 et *Lysobacter albus* YK-422, une nouvelle molécule dont la structure révèle un cycle γ -lactame relié à un groupement isoxazolidinone par une liaison C-N : c'est l'acide [4S]-2-(4-acétylamino-3-oxo-2-isoxazolidinyl)-5-oxo-tétrahydrofurane-2-carboxylique ou lactivicine (Harada *et al.*, 1986) (Figure 61). Le groupement γ -lactame est similaire au noyau cyclosérine dont les propriétés antimicrobiennes ont déjà été utilisées pour traiter des cas de tuberculoses sévères. D'autre part, la structure du groupement allant de l'acide-aminique au groupement carboxyle est relativement similaire à la région fonctionnelle des β -lactamines.

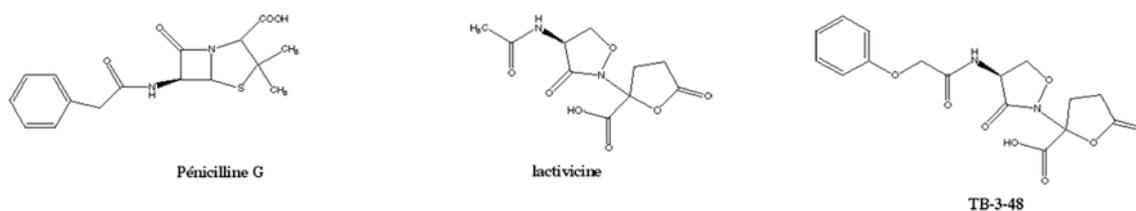


Figure 61 : Schéma des composés Pénicilline G, lactivicine et TB-3-48.

Les premières caractérisations biochimiques montrent une action de la lactivicine contre les bactéries Gram positives et Gram négatives et semblent agir de la même façon que les β -lactamines. En effet, elle possède la capacité d'inhiber les PBP, elle est dégradée par les β -lactamases et induit leur production (Nozaki *et al.*, 1987). Les premières caractérisations bactériologiques montrent une efficacité contre *C. diptheriae* Tront (CMI = 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *S. pyogenes* (CMI = 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *S. pneumoniae* de type I (CMI = 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *S. aureus*

FDA 209P (CMI = 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *S. mitis* America (CMI = 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Harada *et al.*, 1988) et les bactéries anaérobies. En revanche, elle ne montre aucune activité contre les mycoplasma, les champignons et les bactéries sécrétant des β -lactamases (Nozaki *et al.*, 1989).

Des études plus spécifiques sur *E. coli* ont montré que la lactivicine possédait deux activités principales : une activité d'inhibition des enzymes responsables de la synthèse du peptidoglycane (préférentiellement des transpeptidases par rapport aux carboxypeptidases) d'après un schéma d'inhibition classique montré dans la figure 62. Ce type d'inhibition entraîne la lyse cellulaire à une concentration de 1x CMI. La deuxième action semble être ciblée contre les protéases à cystéine (par exemple la papaïne ou la ficine) impliquées dans la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines. L'inhibition de ces fonctions nécessite de fortes concentrations de lactivicine (5x CMI) et est inhibée par l'ajout de 5 mM β -mercaptoéthanol (Nozaki *et al.*, 1989).

Chez *B. subtilis* au contraire, l'inhibition par la lactivicine est dose-dépendante et ne dépend pas du β -mercaptoéthanol. Les cellules deviennent filamenteuses en présence de lactivicine à 1x CMI et lysent à 5x CMI (Nozaki *et al.*, 1989), ce qui représente un comportement classique de l'inhibition par les β -lactamines.

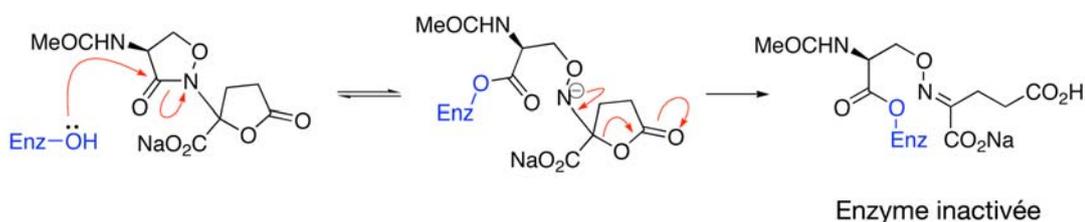


Figure 62 : Schéma du mécanisme d'acylation d'une enzyme de type transpeptidase par la lactivicine.

La faible activité antibactérienne de la lactivicine et sa toxicité naturelle (Harada *et al.*, 1988) ont amené plusieurs groupes à modifier structurellement le noyau lactivicine, pour en améliorer l'efficacité (Baldwin *et al.*, 1991). Les résultats concernant des valeurs de CMI sur la lactivicine et un de ses dérivés, le TB-3-48 dont la structure est présentée en figure 61, sont montrés dans le tableau suivant :

Souches	CMI Lacticine ($\mu\text{g/mL}$)	CMI TB-3-48 ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S. aureus</i> FDA 209P	3,13	0,39
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	100	50
<i>E. coli</i> O 111	100	6,25
<i>Citrobacter freundii</i> IFO 12681	100	50
<i>Klebseliella pneumoniae</i> DT	100	25
<i>Serratia marcescens</i> IFO 12468	>100	>100
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3988	100	12,5

Tableau 16 : Caractérisation bactériologique de deux composés γ -lactames : la lacticine et le TB-3-48. d'après (Baldwin *et al.*, 1991).

II.3.1. Caractérisation structurale des complexes PBP1b*-lacticine et PBP1b*-TB-3-48

Grâce au programme EUR-INTAFAR regroupant 16 laboratoires européens, des molécules chimiques de type γ -lactame ont été synthétisées par un laboratoire de chimie de l'Université d'Oxford dirigé par C. Schofield. Une collaboration a été initiée dans le but de réaliser des études structure-fonction de ces molécules avec diverses enzymes de type transpeptidase. Pour réaliser cette étude nous avons choisi PBP1b, bien qu'elle ne soit pas impliquée dans les mécanismes de résistance, mais parce qu'elle représente la structure à plus haute résolution en ce qui concerne les PBP. Elle représente donc une protéine de choix pour réaliser des expériences de trempage avec de nouvelles molécules et pour tenter de comprendre les interactions impliquées dans la stabilisation de ces complexes.

Nous avons donc utilisé comme précédemment les cocristaux PBP1b*-S2d, préalablement rincés dans une goutte de solution mère puis retrempés dans des solutions de lacticine et de TB-3-48. Les jeux de données sur ces cristaux ont été intégrés puis indexés par le programme XDS et les statistiques de ces jeux de données sont présentées dans le tableau 17 ci-dessous.

collectes	PBP1b*- lactivicine	PBP1b*- TB-3-48
Ligne de lumière	ID14-eh2	ID23-eh2
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	C222 ₁
Paramètres de maille (Å)		
a	98,54	105,84
b	99,83	144,58
c	152,16	97,44
Longueur d'onde (Å)	0,933	0,873
Résolution (Å)	2,6	2,4
Complétude (%)	99,2	99,3
I/σI	11,46 (4,97)	12,94 (2,89)
Redondance	4,7 (4,0)	5,2 (4,7)
Rsym (%)	10,3 (35,8)	9,1 (42,9)

Tableau 17 : Statistiques de traitement des jeux de données PBP1b*-lactivicine et PBP1b*-TB-3-48.

Comme décrit précédemment, le phasage a été réalisé par le programme AMORE en utilisant la structure native de PBP1b* dont les résidus 460, 516-518 et 651-660, susceptibles de se trouver dans différentes conformations selon les modèles, sont supprimés.

Les modèles ont d'abord été affinés avec le programme REFMAC5 sans ajout de ligand. On applique ensuite un cycle de recuit simulé du programme CNS avant de rajouter les composés préalablement créés et décrits dans le programme Monomer Library Sketcher, de façon covalente sur la sérine active 460. Les modèles complexés sont ensuite affinés grâce au programme REFMAC5 jusqu'à atteindre les statistiques décrites dans le tableau 18.

Affinement	PBP1b*- lactivicine	PBP1b*- TB-3-48
Résidus	903	461
Atomes de protéine	8201	4525
Molécules d'eau	76	150
Ions	2 chlores 2 sulfates	1 chlore 1 sulfate
R _{work} (%)	26,57	20,67
R _{free} (%)	30,28	26,2
Rms Déviations		
Liaisons (Å)	0,043	0,028
Angles (°)	3,47	2,398
B global (Å ²)	31,71	29,7
B du ligand (Å ²) (mol A/ mol B)	44,41 / 44,77	38,45
Occupation (%)	100	100

Tableau 18 : Statistiques d'affinement des jeux de données PBP1b*-lactivicine et PBP1b*-TB-3-48.

L'analyse des structures de chacun des sites actifs montre une occupation des ligands de 100% (Tableau 18, Figure 63A et B) et une liaison covalente avec l'atome O_γ de la sérine active Ser-460. Le produit d'inhibition final est conforme à celui présenté dans le mécanisme enzymatique proposé dans la figure 62.

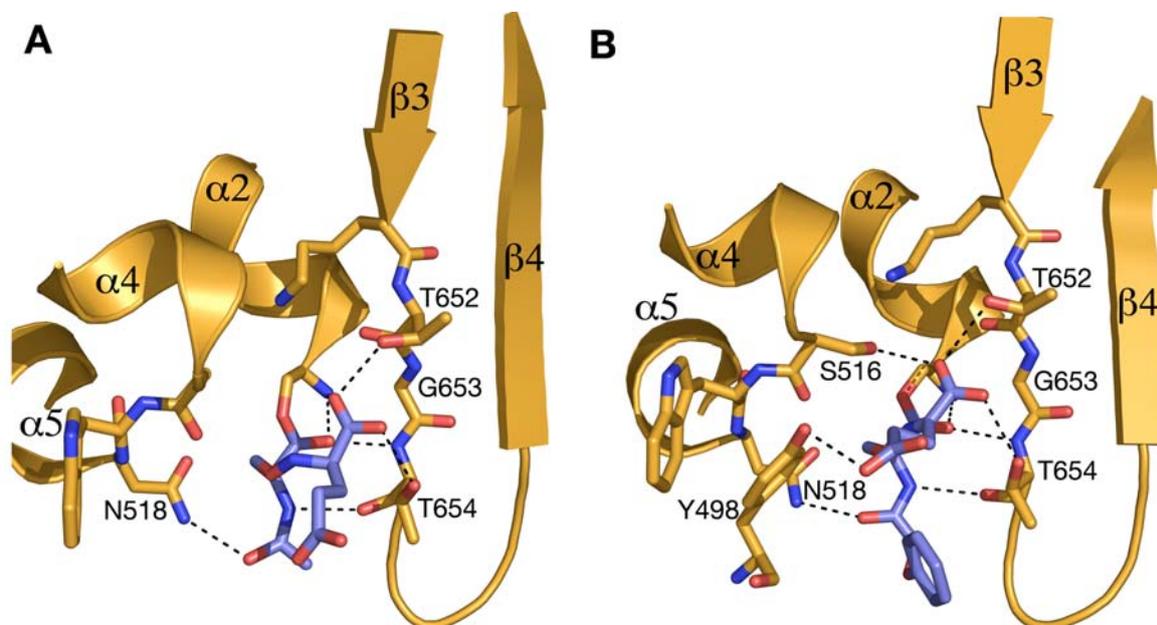


Figure 63 : Représentation schématique de la lactivicine et du TB-3-48 dans la structure de PBP1b*

A : Représentation du site actif de PBP1b*-lactivicine. La lactivicine est représentée en mode bâton en violet et les autres résidus de la gorge catalytique sont en orange. Les interactions de type liaisons hydrogène avec le ligand sont représentées en pointillés. B : Site actif de PBP1b-TB-3-48.

Les interactions de type liaisons hydrogène sont relativement similaires dans les deux cas, montrant l'interaction des inhibiteurs avec des résidus du brin $\beta 3$ et les résidus du deuxième motif conservé (SxN). Une différence importante réside dans l'établissement d'une liaison hydrogène entre la Tyr-498 et l'atome d'oxygène correspondant au groupement R2 du TB-3-48 (figure 63B) qui n'est pas présente dans le complexe PBP1b*-lactivicine. Ce résidu n'est jamais impliqué dans des liaisons hydrogène avec des ligands dans les structures de PBP1b* complexée. Cette interaction est susceptible de stabiliser la molécule TB-3-48 et de la fixer dans une conformation stable.

Bien que nous ne voyons pas d'interaction de type hydrophobe concernant le cycle benzénique du ligand TB-3-48, ce ligand est davantage stabilisé dans la cavité enzymatique, ce qui est illustré par un facteur d'agitation thermique inférieur pour le TB-3-48 à celui de la lactivicine (tableau 18).

II.3.2. Caractérisation fonctionnelle

Nous avons ensuite voulu caractériser plus avant ces molécules et en particulier au niveau enzymatique. Nous avons tout d'abord réalisé des expériences d'acylation en spectrométrie de masse pour vérifier la nature du complexe covalent présent dans notre structure et pour confirmer le mécanisme catalytique de la figure 62. Les résultats sont présentés dans la figure 64. L'acylation de PBP1b* est réalisée avec un excès de lactivicine ou de TB-3-48, puis les échantillons sont analysés en spectrométrie de masse dénaturante par électrospray. La figure 64 montre une acylation covalente par des composés de 272 Da et 364 Da pour la lactivicine et le TB-3-48, respectivement, ce qui est en accord avec le mécanisme d'acylation présenté plus haut.

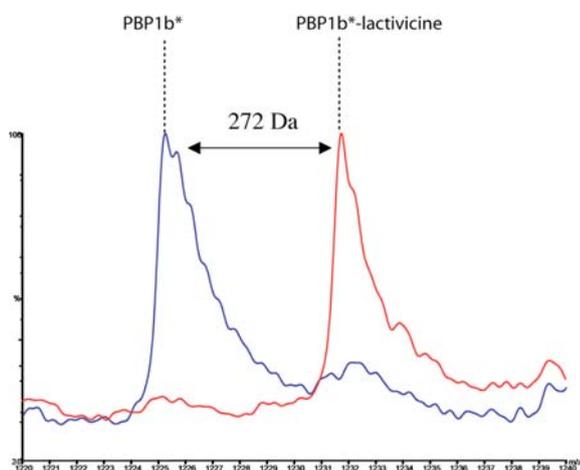
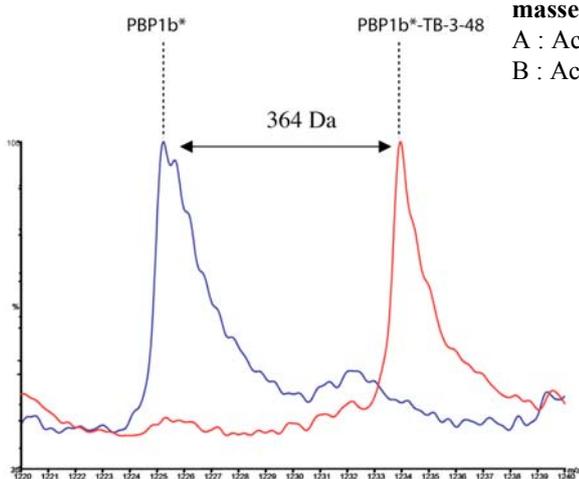


Figure 64 : Spectres de masse montrant l'augmentation de masse lors de l'acylation de PBP1b*.

A : Acylation de PBP1b* par le composé lactivicine.
B : Acylation de PBP1b* par le composé TB-3-48.



La mesure du temps de demi-vie du complexe covalent est effectuée dans un rapport PBP1b*/inhibiteur : 1/1 (molarité/molarité). Les échantillons sont ensuite analysés par spectrométrie de masse dénaturante. Les spectres de masse montrent une acylation totale de

PBP1b* par les deux composés au bout de quelques secondes de réaction. Le complexe covalent pour chaque composé reste stable après 24 heures de réaction, ce qui indique une forte stabilité de ces complexes.

II.3.3. Caractérisation bactériologique

Pour tester l'action de ces inhibiteurs sur différentes souches bactériennes, nous avons déterminé les CMI respectives des souches de *S. pneumoniae* R6 et de deux souches de *S. pneumoniae* résistantes aux antibiotiques, issues de patients des hôpitaux de Briançon et Chambéry, qui ont été mises à notre disposition grâce au docteur J. Croizé du CHU de Grenoble.

Les CMI sont déterminées sur géloses de Columbia Blood Agar supplémentées de 5% de sang de cheval et de différentes concentrations d'inhibiteur. Les bactéries qui se trouvent sur des milieux à des concentrations d'inhibiteur supérieures à la CMI ne poussent pas et laissent donc les géloses avec une couleur rouge sang. Les bactéries se trouvant sur des milieux à des concentrations d'inhibiteur inférieures à la CMI poussent sur ces milieux et lysent le sang de cheval, qui devient marron (Figure 65). La détermination de la CMI est en théorie, la concentration en inhibiteur pour laquelle deux colonies de bactéries sont capables de pousser.

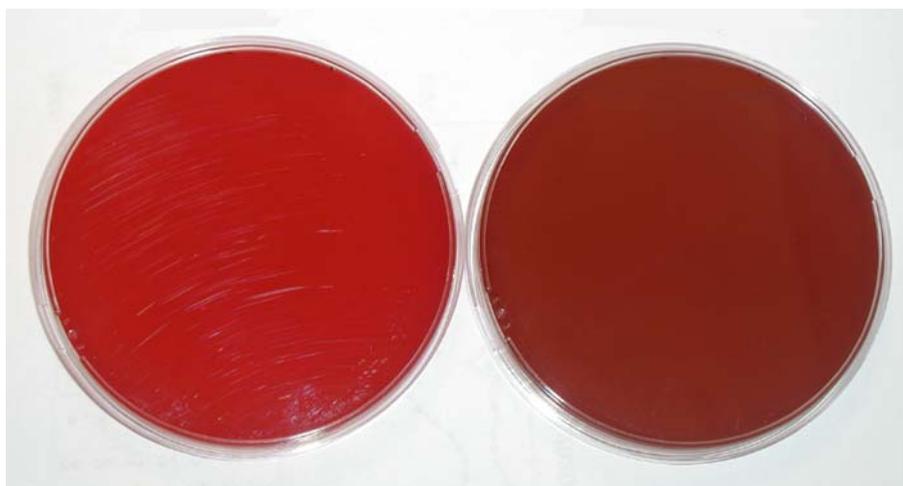


Figure 65 : Détermination de la CMI pour le composé TB-3-48 sur la souche de *S. pneumoniae* R6.

Les valeurs des CMI pour chacune des souches et pour les molécules lactivicine, TB-3-48 et la pénicilline sont résumées dans le tableau 19.

Souches/CMI	CMI pénicilline (µg/mL)	CMI TB-3-48 (µg/mL)	CMI lactivicine (µg/mL)
R6	0,01-0,05	2	15
Briançon	2	20	>100
Chambéry	1,5	10	80

Tableau 19 : Valeurs des CMI déterminées pour les composés pénicilline, lactivicine et TB-3-48 sur les souches de *S. pneumoniae* R6, 38040505 (Chambéry) et 38030509 (Briançon).

Nous avons également réalisé des mesures de densité optique à différents temps après l'ajout d'inhibiteur pour savoir si ces molécules avaient un effet bactériolytique ou bactériostatique. L'ajout d'inhibiteur entraîne la chute de la densité optique à 600 nm après quelques minutes de réaction jusqu'à atteindre une densité nulle au bout de 2 heures, indiquant que ces molécules ont une action bactériolytique.

D'après l'analyse du tableau 19, on observe tout d'abord que la molécule TB-3-48 possède une CMI au moins 7 fois inférieure à celle de la lactivicine, ce qui va dans le sens des valeurs de stabilité des ligands, observées dans les structures cristallographiques. Il semble donc que le groupement phényle supplémentaire soit un élément stabilisateur pour la molécule TB-3-48 aux vues à la fois des facteurs d'agitation thermique de la molécule dans la structure cristallographique et des valeurs de CMI déterminées sur le pneumocoque. L'encombrement de cette molécule est supérieur à celui de la lactivicine grâce à la présence de ce cycle benzénique, qui occupe de façon plus efficace la gorge catalytique pour une inhibition accrue. Comme indiqué dans le chapitre précédent, il est important de noter que la structure cristallographique n'est caractéristique que d'une étape de la réaction et que la compréhension de l'étape de formation de l'intermédiaire tétrahédrique, entre autres, pourrait permettre de mieux appréhender le mécanisme réactionnel et donc de mieux expliquer les différences d'efficacité des deux inhibiteurs.

D'autre part, les valeurs des CMI pour la souche R6 sont entre 5 et 10 fois inférieures à celles mesurées pour les souches résistantes aux β -lactamines. Compte tenu de la structure tridimensionnelle différente de ces « nouveaux » inhibiteurs en comparaison des β -lactamines, nous nous attendions à ne pas voir de mécanisme de résistance de ces nouveaux inhibiteurs. En effet, nous pouvons supposer que le cycle γ -lactame serait assez différent structuralement pour contrecarrer les mécanismes de résistance dus aux PBP modifiées ou aux β -lactamases. Ces résultats semblent malheureusement démontrer que ces « nouvelles » molécules subissent un mécanisme de résistance semblables à celui infligé aux β -lactamines,

ce qui est en accord avec le fait que les modes d'action de ces deux familles d'antibiotiques sont identiques, comme indiqué plus haut.

II.4. Ce que nous ont appris tous ces complexes

Au niveau structural

Les huit structures que nous avons obtenues pendant ce travail de thèse, comportent une structure de PBP1b* native, une structure de PBP1b* en complexe avec un pseudo-substrat de la réaction, le S2d et sept structures de complexes avec des inhibiteurs. La superposition de ces structures montrent une bonne conservation des structures secondaires au niveau du domaine catalytique central. On peut cependant remarquer des différences assez marquées au niveau du domaine N-terminal correspondant à la région de liaison entre les domaines GT et TP, qui semble être légèrement translatée par un mouvement de corps rigide (figure 66). Il est également possible d'observer quelques différences au niveau de la région C-terminale pour laquelle quelques carbones α ne se superposent pas.



Figure 66 : Superposition des structures PBP1b* native (en bleu), PBP1b*-lactivicine (en vert) et PBP1b*-céfotaxime (en jaune)

A partir de ces structures, il a été possible de calculer des déviations entre elles deux à deux, en prenant tour à tour comme référence chacune des huit structures (tableau 20). Ce tableau montre clairement la présence de deux sous-familles distinctes, avec d'un côté :

PBP1b* native, PBP1b*-nitrocéfine, PBP1b*-lactivicine, PBP1b*-AcLys-céphalosporine et PBP1b*-AcLys-pénicilline possédant des valeurs de déviations entre elles comprises entre 0,3 et 0,6. Un deuxième groupe se détache, composé de PBP1b*-TB-3-48, PBP1b*-céfotaxime et PBP1b*-S2d, reliées entre elles par des valeurs de déviations comprises entre 0,4 et 0,58 et séparées du groupe précédent par une valeur minimum de déviation de 0,79.

	native						
TB-3-48	0,857	TB-3-48					
céfotaxime	0,853	0,583	céfotaxime				
AcLys-céphalosporine	0,672	0,847	0,981	AcLys-céphalosporine			
lactivicine	0,700	0,910	0,978	0,360	lactivicine		
nitrocéfine	0,459	0,790	0,766	0,521	0,596	nitrocéfine	
AcLys-pénicilline	0,549	0,819	0,839	0,437	0,496	0,312	AcLys-pénicilline
S2d	0,844	0,579	0,409	0,932	1	0,824	0,894

Tableau 20 : Calcul des déviations entre les huit structures.

L'analyse des groupements chimiques, des liaisons hydrogène, des paramètres cristallographiques et cinétiques de chaque composé ne nous permet pas de conclure sur la présence de ces deux sous-familles, dont la différence structurale est due à un léger mouvement de rotation du domaine de liaison de PBP1b*.

L'explication la plus probable à ce phénomène serait une flexibilité inhérente au domaine de liaison. En effet, on peut concevoir que ce domaine soit responsable de l'orientation du domaine GT par rapport à un substrat potentiel et ainsi posséder une certaine liberté de rotation et de translation pour permettre l'orientation du domaine supplémentaire.

Au niveau du mécanisme

Les nombreuses structures de PBP1b en complexe avec des inhibiteurs, très différents au niveau de leurs chaînes latérales et avec un pseudo-substrat de la réaction, nous permettent de confirmer le mécanisme catalytique général des PBP présenté en introduction dans le chapitre III.2.2.2. Il est important de préciser que les structures cristallographiques que nous avons résolues possèdent une résolution moyenne comprise entre 2.1 et 3 Å, ne permettant pas de décrire de façon très précises les interactions entre les ligands et les résidus de la cavité. Il est donc hasardeux, à partir des données cristallographiques, d'essayer d'expliquer des résultats cinétiques ou bactériologiques, d'autant plus que les structures figées que nous avons obtenues ne décrivent qu'une seule étape de la réaction enzymatique, c'est-à-dire le

complexe covalent acyl-enzyme. Il est tout de même possible de décrire quelques phénomènes communs à toutes ces structures.

En effet, toutes les structures de complexes montrent l'implication des résidus conservés de la triade catalytique (S*xxK, SxN, KTG) engagés soit dans la stabilisation de la molécule de ligand directement, soit dans la stabilisation des résidus fixant le ligand. En particulier, on retrouve les résidus Ser-516 et Asn-518 du deuxième motif, toujours impliqués dans des contacts de type liaisons hydrogène directes avec le ligand. La lysine 463 du premier motif peut, quant à elle, être impliquée directement dans la stabilisation du ligand dans les structures de PBP1b* complexé avec l'AcLys-pénicilline, l'AcLys-céphalosporine, la lactivicine, le TB-3-48 et le S2d ; en revanche, dans les structures en complexe avec la nitrocéfine et la lactivicine, la lysine 463 est impliquée dans la stabilisation des résidus Ser-516 et Asn-518.

Les atomes d'azote de la chaîne principale des résidus Ser-460 et Thr-654 sont toujours impliqués dans la formation du trou de l'oxyanion, permettant la stabilisation du complexe tétrahédrique au cours de l'étape de formation du complexe covalent.

En ce qui concerne l'étape de déprotonation de la sérine active qui précède l'étape d'attaque nucléophile du ligand, il n'est pas possible de discriminer entre le résidu basique Lys-463 et le groupement carboxylate du substrat lui-même, tous deux susceptibles d'être attracteur d'un proton ; pour répondre à cette question, il faudrait pouvoir piéger un intermédiaire de la réaction avant l'étape d'acylation. (Figure 16). Une étude structurale sur les différentes étapes d'acylation de la transpeptidase soluble R61 de *Streptomyces*, semble avancer l'importance de cette lysine du premier motif. Elle agirait de concert avec une tyrosine du deuxième motif, formant un tunnel à proton lors de l'étape de l'activation de la sérine catalytique (Lee *et al.*, 2001)

Dans toutes les structures que nous avons résolues, nous avons pu constater que la Lys-651 du troisième motif catalytique n'était jamais impliquée dans des contacts avec les autres résidus de la cavité enzymatique, ni avec les ligands. Nous avons également remarqué la présence d'une molécule d'eau située à distance raisonnable pour interagir avec cette lysine dans les complexes de PBP1b* avec la lactivicine, la céfotaxime, le S2d ainsi que dans la protéine native. Les distances entre cette molécule d'eau et l'atome d'azote de la lysine oscillent entre 2.6 et 3.2 Å et les angles entre la molécule d'eau, l'atome d'azote et l'atome Cz de la lysine oscillent entre 43° pour la lactivicine et 110° pour le S2d. Il est ainsi possible d'envisager que la lysine Lys-651 soit impliquée dans la déprotonation de cette molécule d'eau, elle-même impliquée dans le mécanisme de désacylation du complexe covalent

enzyme-substrat. Certaines molécules d'eau possèdent cependant des angles qui ne sont pas propices à la catalyse (43° pour la lactivicine et 84° pour la céfotaxime), mais on peut considérer que la structure cristallographique n'est qu'une image statique de la protéine et que les molécules d'eau peuvent bouger légèrement au sein de la cavité pour pouvoir se positionner de façon à être activées pour la catalyse.

Au niveau de la résistance aux antibiotiques chez les PBP de classe A

La structure de PBP1b* a permis de résoudre la structure de PBP1a, une deuxième PBP bifonctionnelle du pneumocoque (Contreras-Martel *et al.*, 2005). PBP1a est impliquée dans la résistance aux antibiotiques et en particulier dans le développement de la haute résistance aux céphalosporines (Munoz *et al.*, 1992; Smith and Klugman, 1998). A partir de l'analyse de séquences de PBP1a issues de souches sensibles et résistantes aux antibiotiques (Asahi and Ubukata, 1998; Chalkley *et al.*, 1991; du Plessis *et al.*, 2002; Smith and Klugman, 1998), il a été possible de cibler trois zones de mutations intéressantes (Figure 42). La première zone se situe au niveau du premier motif catalytique S*TMK, lequel subit une mutation au niveau de la thréonine en alanine ou en sérine et peut causer la destruction du réseau de liaisons hydrogène derrière la cavité enzymatique. Cette mutation a préalablement été répertoriée chez PBP2x du pneumocoque pour plusieurs souches résistantes aux antibiotiques (Mouz *et al.*, 1998). Cette thréonine dans la structure de PBP1a sauvage est enfouie au fond d'une cavité hydrophobe et sa mutation pourrait affecter des interactions non-polaires dans cette région (Contreras-Martel *et al.*, 2005).

La deuxième zone de mutation se situe au niveau de la partie N-terminale de l'hélice α_5 , et en particulier la mutation de la proline 432 en thréonine pouvant déstabiliser cette hélice.

La plus grande région impliquée se situe entre les brins β_3 et β_4 et possède neuf mutations. Cette région correspond à l'entrée de la gorge catalytique et est directement responsable de la formation d'un tunnel, fort probablement impliqué dans la reconnaissance de l'antibiotique. La mutation de ces résidus pourrait affecter l'étape initiale de reconnaissance des antibiotiques par la modification de la forme et des propriétés physico-chimiques de la cavité enzymatique. La résolution de la structure de PBP1a, issue d'une souche résistante aux antibiotiques, en cours actuellement au laboratoire montre que cette zone, correspondant à la boucle entre β_3 et β_4 , n'est pas définie dans la structure cristallographique. Ceci permet d'envisager une certaine flexibilité pour cette boucle située à

l'entrée de la gorge catalytique, pouvant bloquer l'approche des antibiotiques (Viviana Job, communication personnelle).

Au niveau de la synthèse de nouvelles molécules inhibitrices

Le complexe macromoléculaire impliqué dans la synthèse de la paroi bactérienne est une cible majeure pour le développement de nouveaux médicaments. En effet, il contient de nombreuses protéines impliquées dans une voie métabolique essentielle à la survie de la bactérie et absentes chez les humains ; deux caractéristiques importantes pour définir une bonne cible.

Depuis l'introduction de la pénicilline, d'autres molécules de type β -lactame ont été synthétisées ou naturellement découvertes, puis mises sur le marché.

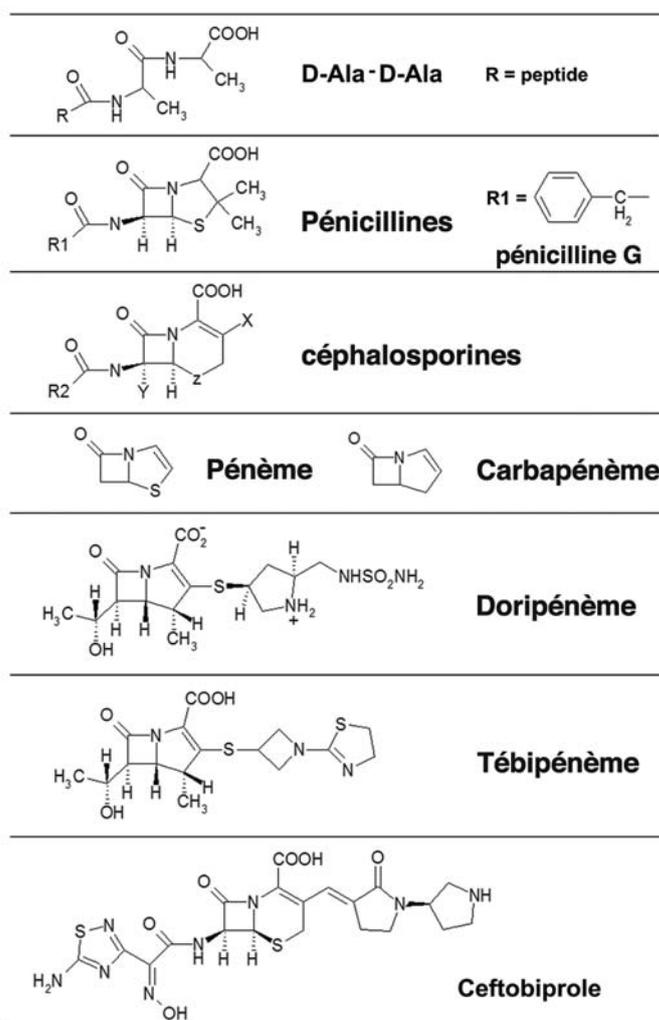


Figure 67 : Structures chimiques des molécules interagissant avec les domaines TP des PBP. L'efficacité des β -lactamines tient à la ressemblance structurale du cycle lactone avec le groupement D-ala-D-ala du pentapeptide. Les groupements R_1 , R_2 , X et Z sont des groupements associés à la structure centrale pour générer des antibiotiques de seconde, troisième ou quatrième génération. (Macheboeuf *et al.*, 2006)

Les carbapénèmes sont des analogues de la pénicilline possédant un cycle à cinq membres de type β -lactame, mais sans l'atome de soufre (figure 67). Ce sont des molécules à large spectre d'action qui possèdent des propriétés bactéricides sur *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* et *Mycobacterium tuberculosis* elles-même résistantes à la plupart des antibiotiques de type β -lactame (Chambers *et al.*, 2005; Coulthurst *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005). Il a cependant été découvert quelques cas de β -lactamases de classe B et D hydrolysant les carbapénèmes et plus rarement de classe A (Nordmann and Poirel, 2002; Peleg *et al.*, 2005).

Les doripénèmes (Figure 67), molécules issues des carbapénèmes sont en études cliniques au Japon et aux Etats-Unis pour le traitement contre les infections respiratoires et urinaires et ont montré une efficacité contre des souches pathogènes résistantes à d'autres β -lactamines (Bush *et al.*, 2004; Fritsche *et al.*, 2005).

Les tébipénèmes (Figure 67), molécules dérivées des doripénèmes pour l'absorption orale, ont montré une efficacité contre des souches résistantes de *S. pneumoniae* ; elles ciblent préférentiellement les PBP 1a, 2b et 3. Elles sont actuellement en phase clinique II au Japon (Kobayashi *et al.*, 2005).

Enfin le ceftobiprole (Figure 67) est une céphalosporine à large spectre d'action de quatrième génération, active contre les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline et à la vancomycine, ainsi que contre les souches de *S. pneumoniae* résistantes à la pénicilline ; il a la capacité de cibler de façon préférentielle la protéine PBP2a qui est elle-même récalcitrante à acyler d'autres β -lactamines (Chambers, 2005; Hebeisen *et al.*, 2001). Le ceftobiprole a été développé par la compagnie pharmaceutique Basilea Pharmaceutica AG et est testé en phase clinique III contre les infections aggravées de la peau et les pneumonies (<http://www.basilea.com>).

Les recherches sur le développement de molécules qui inhibent les transpeptidases se poursuivent maintenant sur deux fronts ; d'une part des équipes cherchent à développer des molécules de type β -lactames modifiées ; c'est le cas les molécules de type γ -lactame que nous avons testées par des méthodes cristallographiques, enzymologiques et bactériologiques. Malgré la forte acylation de ces molécules sur PBP1b, vérifiée à la fois par cristallographie et enzymologie, nous avons pu montrer, à partir de souches de *S. pneumoniae* hautement résistantes aux β -lactamines, que ces molécules étaient malheureusement soumises aux mêmes mécanismes de résistance que leur homologues β -lactames. Il semble que les

mécanismes de résistance se soient maintenant élargis en combinant différents mécanismes de modifications des cibles au niveau moléculaire et en augmentant le nombre et la nature des cibles susceptibles d'être modifiées. Celles-ci semblent avoir atteint une certaine plasticité leur permettant de s'adapter à toutes sortes de molécules ressemblant de près ou de loin au cycle lactame et, les quelques modifications apportées à la structure de base de ces molécules ne sont probablement pas une « solution miracle » au problème de la résistance aux antibiotiques.

Une deuxième solution consiste à cibler les mêmes transpeptidases, mais avec des molécules totalement différentes des β -lactamines classiques qui ne seraient pas susceptibles de générer des mécanismes de résistances croisées. Dans cette optique, de nouvelles molécules de type arylakylidène semblent affecter la biosynthèse de la paroi bactérienne en ciblant les PBP 2x de *S. pneumoniae* et 2a de *S. aureus* (Zervosen *et al.*, 2004) et pourraient être des points de départ intéressants pour le développement de molécules inhibitrices non β -lactames. Au sein du consortium EUR-INTAFAR, nous avons pu avoir accès à des molécules de type inhibiteurs non covalents, susceptibles de cibler les PBP, ce qui a été montré par dynamique moléculaire (Schofield, C., communication personnelle). Malheureusement, les nombreux tests de cocrystallisation et de trempages de notre PBP1b* avec ces molécules n'ont pas abouti à une structure de PBP1b* complexée à une de ces molécules. Ces ligands étant solubles dans des solvants organiques, les conditions de trempages et de cristallisation devraient être très différentes de celles que nous avons testées, ce qui aurait impliqué de plus amples études pour mettre en place des conditions d'obtention d'un complexe enzyme-substrat.

Une stratégie différente de recherche de nouveaux inhibiteurs consiste en la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et en particulier le domaine GT des PBP qui est essentiel à la survie de la bactérie. Les domaines GT des PBP ne possèdent que peu ou pas de similarité de séquence avec d'autres glycosyltransférases et n'ont jamais été étudiés d'un point de vue structural. Il est probable que ces enzymes possèdent un nouveau repliement et soient des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux antibiotiques.

C'est dans cette optique que nous nous sommes attachés à étudier le domaine GT de PBP1b du pneumocoque, études qui sont présentées dans le chapitre suivant.

III. Etudes biochimiques et structurales du domaine glycosyltransférase de PBP1b

Jusqu'à présent peu de groupes ont réussi à isoler et purifier un domaine GT soit d'une PBP, soit d'une GT monofonctionnelle. Aucune des constructions obtenues n'a donné lieu à une structure cristallographique ce qui laisse supposer que : soit le domaine de liaison entre les domaines GT et TP est flexible, soit le domaine GT, sorti de son environnement membranaire, est un domaine trop instable.

III.1. Etudes biochimiques des différentes constructions de GT

III.1.1. Clonage des différentes constructions de GT

Comme indiqué dans le chapitre concernant la résolution de la structure de PBP1b*, nous avons réussi à obtenir la structure d'un fragment du domaine GT, resté accroché au reste de la protéine, malgré les étapes de purification. Ce peptide, formant deux brins β a et β b (Figure 43A), se situe au niveau du domaine de liaison. Il forme un feuillet à 5 brins avec un brin du domaine de liaison et deux provenant du domaine TP lui-même. A partir de ces observations, nous avons pu exclure l'hypothèse de la flexibilité éventuelle du domaine de liaison et nous avons émis l'hypothèse que la partie du GT « piégée » dans notre structure constituait le point de départ du domaine stable, la partie située en N-terminal constituant une portion instable de la protéine. A partir de ces informations, nous avons réalisé différentes constructions de PBP1b dans l'espoir d'obtenir un domaine GT stable dont nous pourrions résoudre la structure cristallographique.

Les différentes constructions réalisées sont présentées dans la figure 68 ci-dessous.

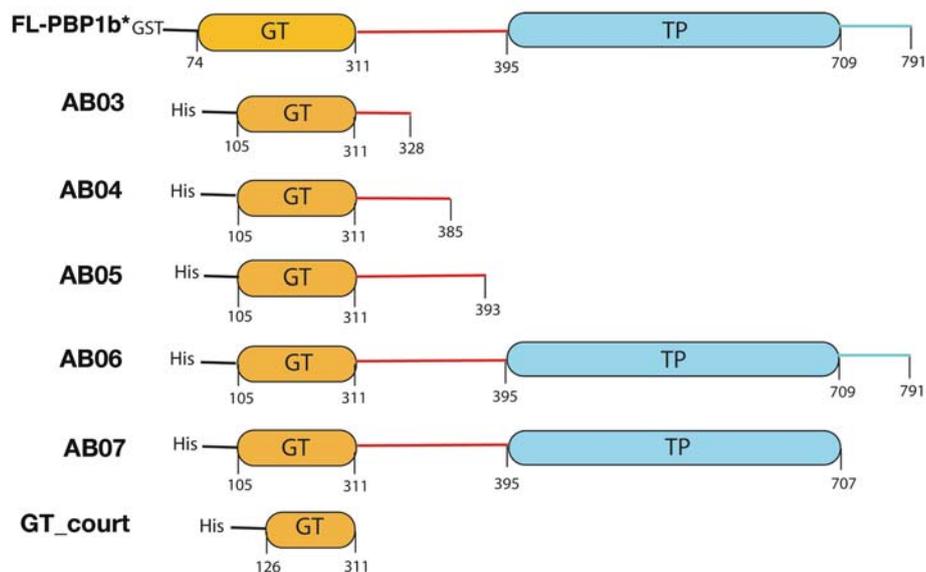


Figure 68 : Schéma des différentes constructions de GTs.

FL-PBP1b* correspond à la partie périplasmique de PBP1b et sert de référence pour comparer les bornes des différents domaines. Les étiquettes utilisées pour la purification des protéines sont indiquées : GST pour Gluthatione-S-transférase et His pour étiquette poly-histidines.

III.1.2. Essais de purification des différentes constructions

Les constructions de la série Abxx ont été clonées puis exprimées en petit volume sur la plate-forme RoBioMol par Benoît Gallet et Marjolaine Noirclerc-Savoie du LIM. Les rapports des tests d'expression en petit volume fournis par l'équipe, indiquaient une bonne expression des clones dans toutes les conditions testées, et les protéines correspondantes semblaient solubles.

Les caractéristiques des différents clones sont présentées dans le tableau suivant :

	FL-PBP1b*	PBP1b*	AB03	AB04	AB05	AB06	AB07	GT_court
Nombre de résidus	718	511	237	294	302	700	616	185
Masse moléculaire (Da)	78212	56102	25837,0	32431,3	33253,2	76629,7	67751,9	19658
Point isoélectrique	5,22	5,07	6,59	6,12	6,29	6,26	6,34	6,12

Tableau 21 : Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des différentes constructions de PBP1b.

Les tests en grand volume (1L) que nous avons ensuite réalisés n'ont pas permis d'obtenir de protéine soluble puisque toute la protéine exprimée était présente dans des corps d'inclusion, sous forme agrégée. Pour solubiliser ces agrégats, nous avons testé l'expression

de ces clones dans deux milieux de cultures différents : le milieu LB Broth Lennox et un milieu d'auto-induction (MAI) dont les compositions sont présentées en Annexe A. Nous avons également testé l'influence de détergents sur la solubilisation de nos protéines et en particulier celle de CHAPS introduit dans la solution de solubilisation des culots bactériens lors de la lyse par sonication. Les tests d'expression de chaque protéine sont effectués sur des volumes de culture de 10 mL pour chaque milieu de culture, et en présence ou non de 1% CHAPS dans la solution de lyse. Chacun de ces quatre essais est ensuite soumis à centrifugation pour séparer les protéines solubles de la fraction insoluble. Le surnageant est ensuite déposé sur une colonne d'affinité de type Chélatant-Sépharose. Les résultats obtenus pour le clone AB06 sont présentés dans la Figure 69.

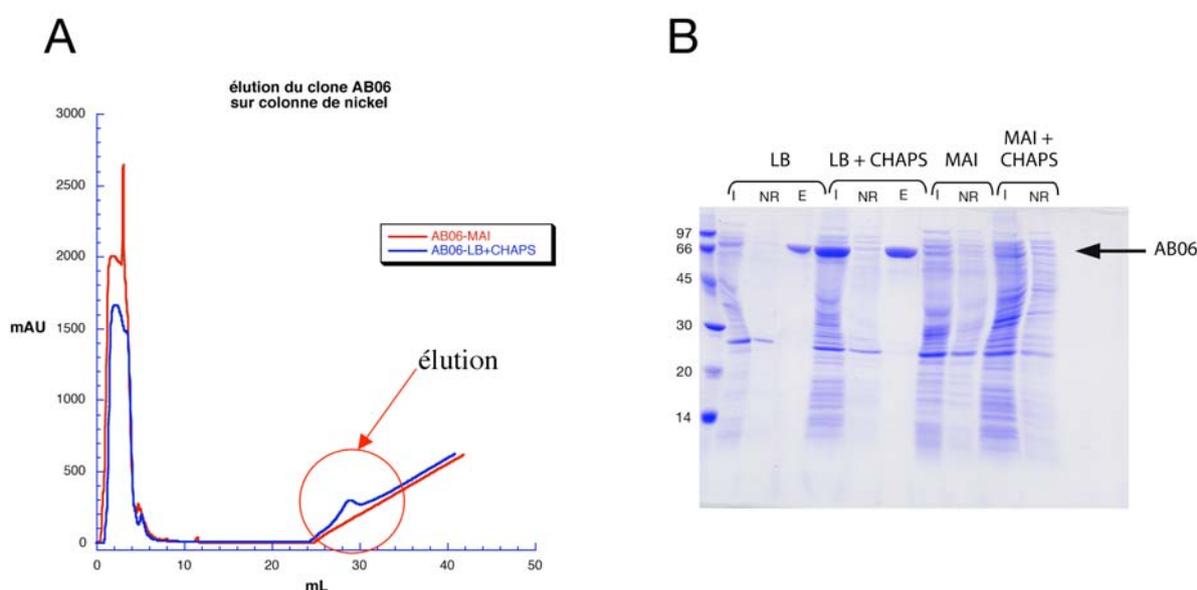


Figure 69 : Résultats des tests d'expression du clone AB06.

A : Profils d'élution de la colonne Chélatant-Sépharose pour le test AB06 en milieu d'auto-induction sans CHAPS (en rouge) et pour celui en LB avec addition de CHAPS (en bleu). Les fractions correspondant à l'élution par ajout d'imidazole sont entourées en rouge. B : Gel SDS montrant pour chaque condition, les échantillons injectés (I), non retenus sur la colonne (NR) et élués (E). Les bandes correspondant au poids moléculaire attendu pour AB06 sont indiquées en face de la flèche.

On remarque sur la Figure 69A qu'une large proportion des protéines ne sont pas retenues sur la colonne (entre 0 et 10 mL) et que l'élution n'est présente que dans certaines conditions de tampon. En ce qui concerne le clone AB06, nous avons obtenu un pic d'élution à l'imidazole dans le cas de la protéine exprimée en milieu LB avec ou sans ajout de CHAPS. En revanche, aucune élution n'était visible pour la protéine exprimée en milieu d'auto-induction. Ces résultats sont confirmés sur gel SDS dénaturant, montrant une bande dont le

le poids moléculaire apparent correspond à celui de AB06 pour les fractions d'élution correspondant aux conditions LB et LB avec 1% CHAPS (Figure 69B).

Ces expériences ont été reproduites pour chacun des clones et les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Clone	Résidus	Conditions de solubilisation	Essais de cristallisation
AB03	105-328	aucune	
AB04	105-385	LB+CHAPS	
AB05	105-393	LB+CHAPS ou MAI+CHAPS	oui
AB06	105-791	LB+CHAPS ou LB	oui
AB07	105-707	aucune	
GT_court	126-311	aucune	

Tableau 22 : Récapitulatif des meilleures conditions de milieu d'expression et de tampon pour solubiliser les différentes constructions GT de la série ABxx.

En ce qui concerne les constructions que nous n'avons pas réussi à solubiliser, nous avons réitéré ces expériences en testant différents agents solubilisant (30% glycérol, 1,5 M NaCl, 2% Tween 20) à différentes températures, sans succès.

Nous avons ensuite voulu améliorer la qualité de notre meilleur candidat en termes de solubilité et de construction, le clone AB06. Pour cela, nous avons recloné cette construction contenant les résidus 105 à 791 dans un vecteur pET15b. Ceci a été réalisé dans le but d'ôter l'étiquette poly-histidines grâce à un site de coupure à la protéase thrombine entre l'étiquette et la protéine afin d'améliorer la cristallogénèse. Cependant les tests de solubilité de cette nouvelle construction, dans différentes souches d'expression (BL21, BL21-RIL) ne nous ont pas permis d'obtenir de la protéine soluble.

Après avoir réalisé les contrôles préliminaires en spectrométrie de masse, nous avons entrepris des tests de cristallisation des deux constructions les plus prometteuses, les constructions AB05 et AB06, mais toujours sans succès.

III.1.3. Purification du domaine GT_[74-321]

Anne-Marie Di Guilmi du LIM a ensuite réalisé un clone du domaine GT de PBP1b selon les bornes déterminées de façon théorique à partir de la position des résidus conservés dans chaque domaine. Cette construction contient les résidus 74 à 321 et contient le domaine GT entier.

L'expression du domaine GT_[74-321] s'effectue en corps d'inclusion et nécessite tout d'abord des étapes de lavage du culot bactérien (figure 70, pistes L1 à L4) suivies d'une étape de dénaturation en urée (figure 70, piste dénat) permettant la solubilisation de la protéine. L'étape de purification sur colonne Chelating-Sepharose permet de sélectionner les protéines contenant une étiquette poly-histidine et dans notre cas, le GT_[74-321] est élué à 50mM imidazole (figure 70, piste Chel-Sephar). A l'issue de cette étape de purification, le rendement atteint 18mg/L de culture. L'étape finale, la plus critique, semble être celle de renaturation qui correspond à l'élimination progressive de l'urée par dialyse à 4°C. Le pouvoir d'oxydoréduction (GSH-GSSG) ajusté par comparaison à certains protocoles de renaturation s'avère être un élément déterminant dans la renaturation du GT_[74-321], malgré l'absence de cystéine dans ce domaine. En effet, l'expérience effectuée sans ce pouvoir d'oxydoréduction conduit à la précipitation de la protéine. Après renaturation le GT_[74-321] ne reste pas stable longtemps et montre dans un premier temps une digestion par des protéases (figure 70, piste filt. gel) puis une agrégation (figure 73, courbe verte).

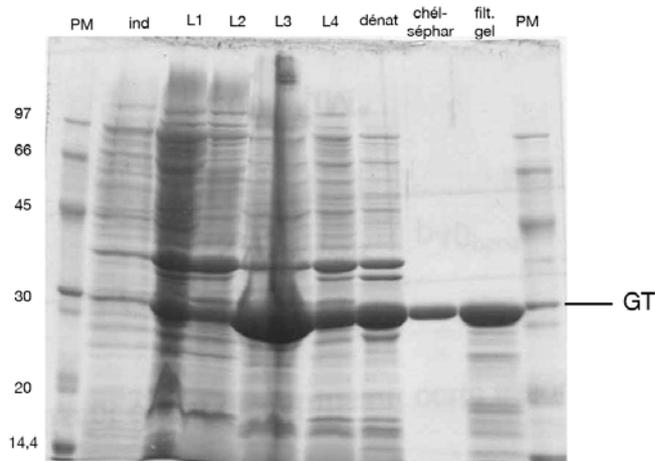


Figure 70 : Gel SDS montrant les différentes étapes de purification de la construction GT_[74-321]. Ind : fraction induite ; L1 à L4 : lavages successifs du culot ; dénat : étape de dénaturation de la protéine ; Chél-sépar : fraction en sortie de la colonne d'affinité ; filt. gel : fraction en sortie de la colonne d'exclusion ; PM : marqueur de poids moléculaire.

III.1.4. Utilisation des anticorps pour stabiliser les différents domaines de PBP1b

Dans le but de stabiliser les domaines de PBP1b soit séparément, soit au sein de la protéine entière, nous avons caractérisé biochimiquement des Fabs d'anticorps monoclonaux et cherché à connaître leurs sites d'interactions. En effet, la cristallisation des protéines est souvent limitée par des problèmes d'hétérogénéité, d'insolubilité, de flexibilité moléculaire ou du caractère polydisperse de la solution. Certains fragments Fab possèdent une solubilité raisonnable et s'accrochent spécifiquement aux antigènes. Un complexe Fab-Antigène

possède des chances plus importantes de former des cristaux. Dans le cas de la « reverse transcriptase » du VIH, le fragment Fab agit comme une pince capable d'immobiliser une région de l'enzyme (Jacobo-Molina *et al.*, 1991; Jacobo-Molina *et al.*, 1993). De plus, les fragments d'anticorps sont bien adaptés à la co-cristallisation car ils ont à la fois une haute spécificité et une forte affinité. L'homogénéité est obtenue avec des fragments dérivant d'anticorps monoclonaux (Ostermeier *et al.*, 1995).

Les cinq anticorps monoclonaux murins (19B5, 19F8, 5E9, 1D6 et 4B4) élaborés par Patrick Méresse à Hybrisère, possèdent deux parties distinctes. La génération de la partie Fab s'accrochant à l'antigène est isolée grâce à une coupure protéolytique à la papaïne (Figure 71A). La purification par colonne monoQ libère la partie Fab (figure 71B, pistes 9 à 11) formée de deux chaînes de masses apparentes d'environ 25 kDa et la partie Fc (figure 71B, pistes 3 à 8). La solution correspondant à la partie Fab hautement soluble, est ensuite concentrée pour atteindre 4 à 6 mg/mL.

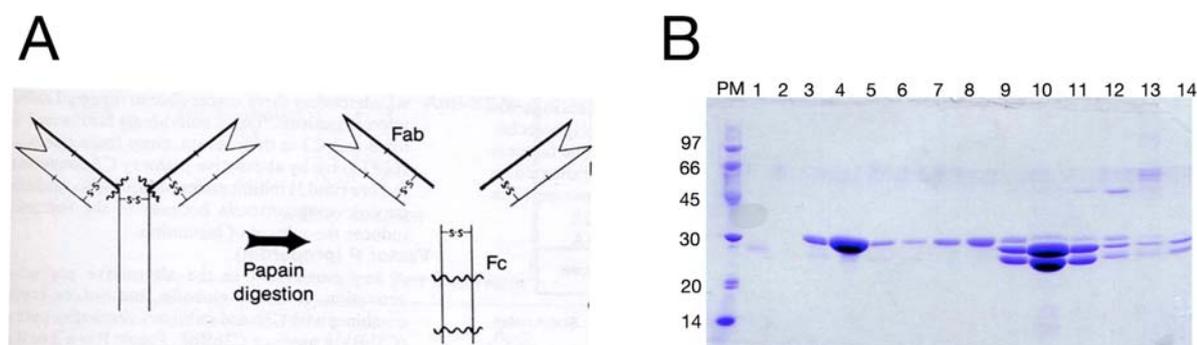


Figure 71 : Purification des fragments Fab d'anticorps monoclonaux. A :Schéma de la coupure des fragments Fab avec la papaïne. B : Gel SDS montrant la purification des anticorps sur une colonne échangeuse d'anions monoQ. Les fractions 1 à 8 correspondent à la partie Fc (chaîne lourde) et les fractions 9 à 14 correspondent à la partie Fab. PM : marqueur de poids moléculaire.

Les expériences de liaison des Fabs aux différents domaines de PBP1b ont été effectuées grâce à une chromatographie d'exclusion de taille utilisant une colonne Superdex 200 (Pharmacia).

Interaction des Fabs avec PBP1b*

Lors des expériences de chromatographie d'exclusion réalisées sur PBP1b*, nous avons pu observer des profils d'élution différents selon les Fabs testés. D'autre part, nous avons pu corréler les volumes d'élution aux masses des complexes par la calibration à partir d'un kit de protéines de masses connues. La partie fixatrice d'antigène ou Fab purifiée, possède deux fois deux chaînes de 25 kDa chacune, reliées par un pont disulfure. Dans le cas

des Fabs qui n'interagissent pas avec PBP1b*, on observe un profil de co-élution des Fabs et de la protéine, puisque les deux entités possèdent des masses voisines, aux alentours de 50 kDa. Les Fabs et la protéine sont visibles ensemble sur gel SDS dénaturant (résultats non montrés). Ce profil a été observé pour les Fabs des anticorps 19B5, 19F8 et 5E9. En revanche, les Fabs des anticorps 1D6 et 4B4 ont montré un profil d'élution caractéristique d'un complexe Fab-PBP1b*. En effet, on observe un déplacement du pic d'élution pour le complexe, par rapport aux pics de PBP1b* seul (Figure 72, courbe verte) et du Fab seul (figure 72, courbe rouge). Le premier pic d'élution (volume de 13,5 mL en bleu) analysé sur gel SDS dénaturant confirme la présence de Fab et de PBP1B* (résultats non montrés) et après calcul des masses, à la fixation d'une molécule d'anticorps pour une molécule de PBP1b*. Le deuxième pic d'élution (volume de 16 mL en bleu) correspond au Fab seul.

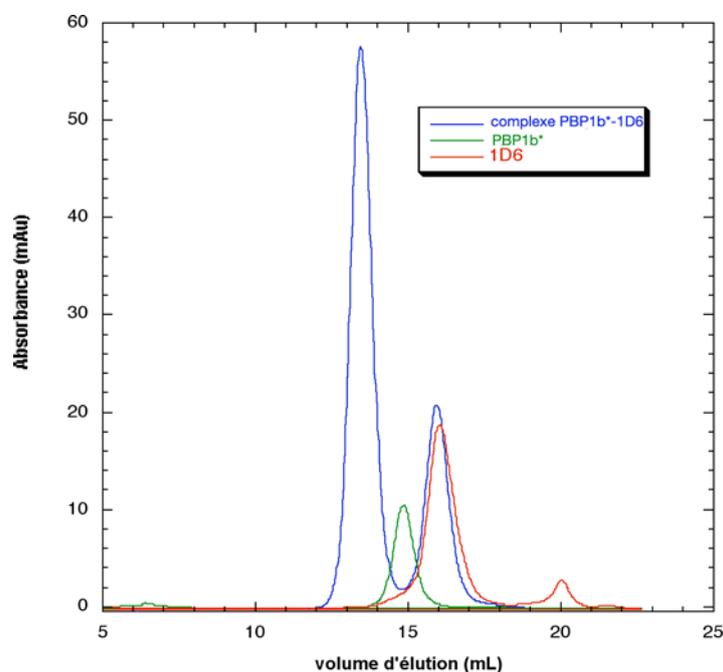


Figure 72 : Profil d'élution de la colonne d'exclusion sur gel montrant la fixation du Fab de l'anticorps monoclonal 1D6 sur PBP1b*.

La courbe d'élution correspondant à PBP1b* est en vert, celle de l'élution du Fab 1D6 en rouge et la courbe montrant le complexe Fab-PBP1b* est en bleu.

Interaction des Fabs avec GT_[74-321]

En ce qui concerne les expériences de chromatographie d'exclusion sur le domaine GT_[74-321], le profil d'élution du GT seul après deux jours à 4°C semble montrer que cette protéine est très instable en dépit des ajouts d'inhibiteurs de protéases dans la solution. En effet, l'élution montre un pic diffus s'étalant de 6 à 17 mL (figure 73, courbe verte) semblant correspondre au GT agrégé, ainsi qu'un pic à 19 mL de masse calculée d'environ 5 kDa

pouvant correspondre à une mixture de peptides générés par coupure protéolytique. Ce résultat est confirmé par gel SDS (figure 70, piste Filt. gel). En dépit de la mauvaise qualité du domaine GT, il a été possible d'observer des profils d'éluion différents selon les Fabs testés. On observe pour les fragments Fab 19B5 et 5E9 un déplacement du pic d'éluion pour le complexe (Figure 73, courbe bleue) par rapport aux pics du GT seul (Figure 73, courbe verte) et du Fab seul (figure 73, courbe rouge), avec la fixation de deux fragments Fabs pour une molécule de GT. Le premier pic de la courbe bleue à 13 mL correspond au complexe 19B5-GT, le deuxième pic à 15 mL correspond à un excès de Fab et enfin le pic à 19 mL correspond au peptide dégradé du GT. De plus, le pic diffus présent lors de l'éluion du GT seul (courbe verte) disparaît au profit d'un pic stable de complexe. Il semble donc que les Fab 5E9 et 19B5 soient capables de désagréger le domaine GT_[74-321]. Pour les Fabs des anticorps 1D6 et 4B4 les profils d'éluion ne montraient pas ce déplacement de pic vers la gauche, indiquant que les deux Fabs ne sont pas spécifiques du domaine glycosyltransférase. Le Fab de l'anticorps 19F8 n'a pas pu être caractérisé en raison de la faible quantité dont nous disposions.

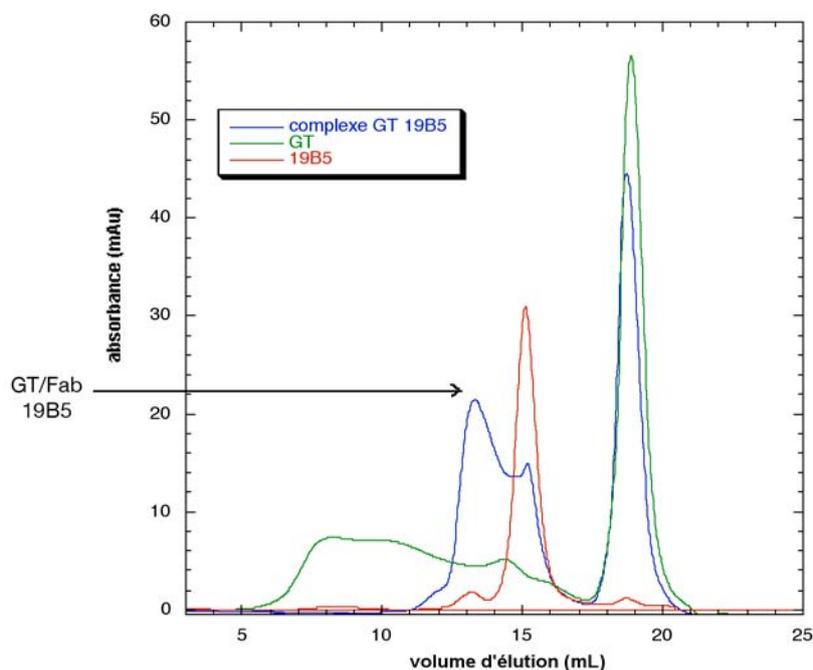


Figure 73 : Profil d'éluion de la colonne d'exclusion montrant la fixation du Fab de l'anticorps monoclonal 19B5 sur GT_[74-321].

La courbe d'éluion correspondant à GT_[74-321] est en vert, celle de l'éluion du Fab 19B5 en rouge et la courbe montrant le complexe Fab-GT est en bleu.

Les résultats concernant les interactions entre les différents domaines de PBP1b avec les Fabs d'anticorps sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Domaines Fab	5E9	19B5	1D6	4B4	19F8
PBP1b*	Pas d'interaction	Pas d'interaction	Interaction	Interaction	Pas d'interaction
GT_[74-321]	Interaction	Interaction	Pas d'interaction	Pas d'interaction	?

Tableau 23 : Récapitulatif des interactions entre les fragments Fab des différents anticorps monoclonaux sur PBP1b* et GT_[74-321], déterminées par filtration sur gel.

III.1.5. Essais de cristallogenèse

A partir de ces résultats encourageants, en particulier en ce qui concerne la « désagrégation » du domaine GT_[74-321] en présence de deux fragments d'anticorps monoclonaux, nous avons entrepris de nombreux essais de cristallisation avec des échantillons de GT_[74-321] en complexe stoechiométrique (1/1) (molarité/molarité) avec les Fabs 19B5 et 5E9. Nous avons également réalisé des complexes entre les protéines AB05 et AB06 avec les mêmes fragments d'anticorps. Malheureusement, nous n'avons jamais pu obtenir de cristaux pour aucun de ces complexes. Ces résultats restent cependant très prometteurs pour espérer solubiliser des domaines GT à caractère membranaire puisque les fragments d'anticorps pourraient masquer certaines zones hydrophobes et les rendre plus solubles pour des expériences de cristallisation. En revanche les faibles quantités d'anticorps purifiés dont nous disposons, ne nous permettent pas de les utiliser dans les premières phases de purification des protéines, pour espérer empêcher l'agrégation lors des premières étapes de solubilisation des culots bactériens.

III.2. Etudes structurales de la forme périplasmique de PBP1b en solution par SAXS

Les nombreux essais de cristallogénèse de différentes constructions du domaine glycosyltransférase et de la protéine entière périplasmique n'ayant donné aucun résultat, nous nous sommes tournés vers la diffusion des rayons X aux petits angles. Cette technique a l'avantage d'utiliser une protéine en solution, permet tant de s'affranchir du problème de la cristallogénèse. En revanche, si la préparation de l'échantillon est simple comparée à l'obtention de cristaux, les informations contenues dans les données de diffusion sont limitées par rapport aux données à haute résolution de cristallographie. En effet, les particules en solution diluée et monodisperse, adoptent toutes les orientations dans l'espace de part le mouvement brownien. La seule grandeur accessible expérimentalement est donc la moyenne des intensités de diffusion. L'extraction de données à trois dimensions requises dans les expériences de biologie structurale à partir d'un diagramme de diffusion à une dimension explique la difficulté et les limites de la méthode.

Un des avantages de la diffusion aux petits angles en solution réside dans la sensibilité de la méthode envers les domaines flexibles et/ou mal définis qui, dans les cartes de densité électronique lors des analyses cristallographiques, sont ininterprétables ou indétectables. C'est dans cette optique que nous avons utilisé cette technique, pour confirmer nos hypothèses concernant le positionnement du domaine GT et pour extraire une enveloppe structurale de ce domaine de repliement inconnu.

III.2.1. Extraction des paramètres structuraux

Pour ces expériences, nous avons utilisé à la fois la forme entière périplasmique de PBP1b : FL-PBP1b* et la forme protéolysée ayant abouti à la structure cristallographique : PBP1b*. La diffusion sur les solutions de protéines a été mesurée dans une gamme du vecteur de diffusion $0,01 \text{ \AA}^{-1} < Q < 0,53 \text{ \AA}^{-1}$, ce qui correspond dans l'espace réel à $625 \text{ \AA} > r > 11,8 \text{ \AA}$.

Les paramètres structuraux concernant la forme globale des deux molécules, extraits à partir des courbes de diffusion, ont été déterminés par Patrice Vachette à l'Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire de l'Université Paris-sud.

Paramètres structuraux de PBP1b*

Une première étape consiste à déterminer le rayon de giration (R_g) à partir de l'approximation de Guinier valable aux très petits angles (pour $Q.R_g < 1,3$), grâce au programme PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003). Le rayon de giration calculé pour PBP1b* à partir des données de diffusion est de $25 \pm 0,2$ Å. D'autre part, l'analyse des coordonnées de la structure cristallographique par le programme CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995), permet de calculer la courbe de diffusion théorique de cette structure et donc de déterminer un rayon de giration à partir de cette courbe. Le rayon de giration déterminé à partir de cette méthode, sur la structure cristallographique est de 24,74 Å, proche de la valeur déterminée expérimentalement. Dans un troisième temps, nous avons estimé ce rayon de giration par la fonction de distribution des distances $p(r)$, déterminée à partir de l'ensemble de la courbe de diffusion, permettant de déterminer un R_g de $25,9 \pm 0,2$ Å.

La différence entre le rayon de giration obtenu à partir de la structure cristallographique et celui obtenu par les courbes de diffusion de PBP1b* en solution, peut s'expliquer par la différence de 38 ou 56 résidus (selon la protéine en solution considérée : PBP1b* à 51414 Da ou PBP1b* à 53520 Da) entre la structure cristallographique et la protéine en solution.

La fonction $p(r)$ correspond à la distribution des distances interatomiques de la molécule et possède une forme en cloche (figure 74). La valeur de r pour laquelle $p(r) = 0$ correspond à la distance maximale entre deux atomes de la molécule et donc à la plus grande dimension de la protéine (D_{\max}). La valeur de D_{\max} calculée à partir du programme GNOM (Svergun, 1992) sur la courbe de diffusion de PBP1b* en solution est de 85 ± 5 Å. Si on mesure la distance entre les résidus les plus extrêmes de la structure cristallographique de PBP1b*, on trouve une valeur de 84 Å entre l'Asn-385 et la Lys-744, ce qui est en accord avec la valeur calculée à partir de la courbe de diffusion expérimentale.

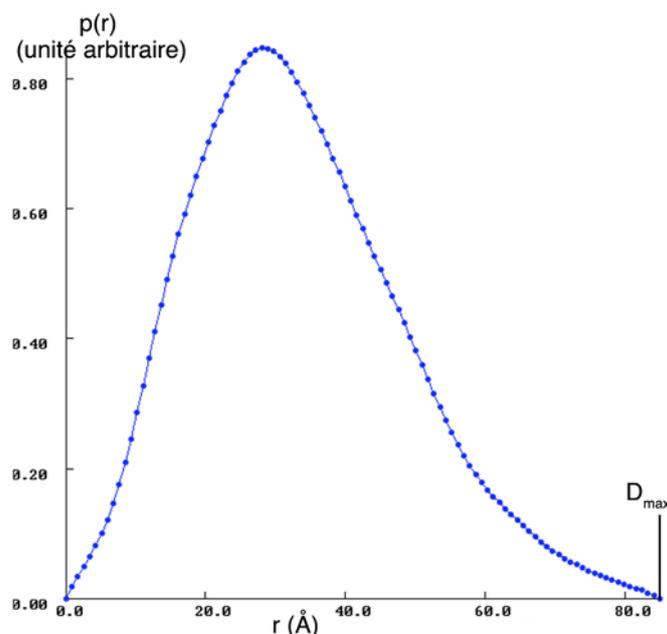


Figure 74 : Représentation de la fonction de distribution de paires $p(r)$ pour la diffusion de PBP1b*.

La courbe $p(r)$ de la figure 74 montre un maximum pour $r = 28 \text{ \AA}$ ($< D_{\max}/2$), ce qui est caractéristique d'une protéine allongée, en accord avec la structure cristallographique oblongue de PBP1b*.

Paramètres structuraux de FL-PBP1b*

Le rayon de giration de FL-PBP1b*, calculé à partir de l'approximation de Guinier, nous donne une valeur de $34,8 \pm 0,3 \text{ \AA}$. L'estimation du rayon de giration par le calcul de la fonction de distribution des paires $p(r)$ donne un R_g de $35,45 \pm 0,3 \text{ \AA}$, ce qui est en accord avec la valeur précédente.

L'allure de la courbe $p(r)$ pour FL-PBP1b* présentée en figure 75 montre une courbe en forme de cloche asymétrique avec une queue s'étendant jusqu'à la valeur de $D_{\max} = 115 \pm 5 \text{ \AA}$. L'allure de la courbe asymétrique et possédant un maximum pour $r = 29 \text{ \AA}$ ($< D_{\max}/2$), nous permet de confirmer que la protéine est très allongée.

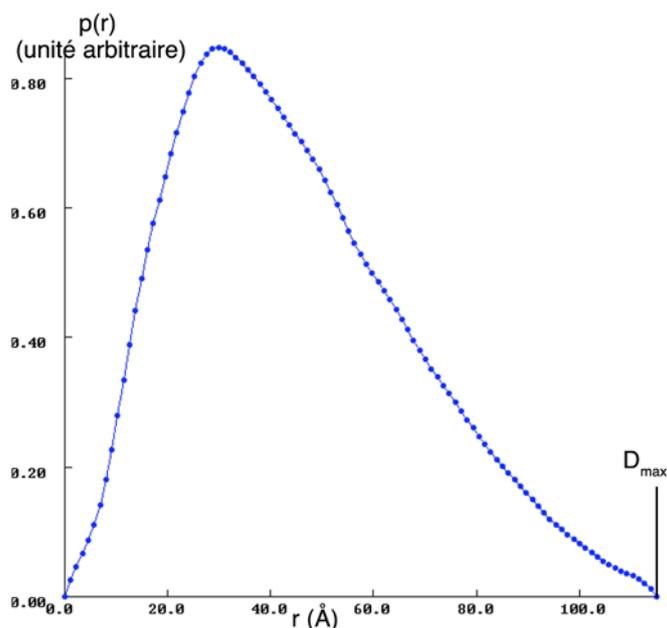


Figure 75 : Représentation de la fonction de distribution de paires $p(r)$ pour la diffusion de FL-PBP1b*.

III.2.2. Modélisation *ab initio*

Afin de déterminer une enveloppe à basse résolution de FL-PBP1b*, nous avons utilisé dans une première approche le programme DAMMIN (Svergun, 1999). Celui-ci représente la protéine comme une suite de boules positionnées selon un réseau hexagonal compact et utilise une méthode de recuit simulé pour construire un modèle compatible avec les données de la courbe expérimentale sous des contraintes assurant la connectivité et la compacité du modèle.

*Modélisation ab initio de PBP1b**

Etant donné que la modélisation dans l'espace à partir d'une courbe de diffusion ne donne pas de solution unique, nous avons réalisé dix modèles indépendants à partir de la même procédure du programme DAMMIN. Ces modèles ne convergent pas vers une solution unique et ne sont pas non plus moyennés, mais forment une galerie de formes. Ces différents modèles sont ensuite comparés entre eux par le programme DAMAVER (Volkov and Svergun, 2003) qui détermine la valeur d'une pseudo-distance dite « Normalized Spatial Discrepancy » (NSD) entre les modèles, utilisée pour mesurer le degré de similarité entre les modèles et donc la stabilité de la solution. Des modèles similaires possèdent typiquement des valeurs de NSD proches ou inférieures à 1. Les valeurs de NSD entre nos modèles oscillent entre 0.48 et 0.6, indiquant une excellente corrélation et donc une grande stabilité de la

solution. L'enveloppe contenant tous ces modèles superposés est ensuite réinjectée comme volume de départ d'un ultime cycle de DAMMIN..

La courbe de diffusion expérimentale en fonction de $Q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ est ensuite comparée à la courbe de diffusion théorique du modèle issu de DAMMIN. L'accord entre les deux courbes de diffusion est mesuré par le facteur χ , qui est proche de, ou inférieur à 1 dans le cas d'une bonne superposition des courbes.

La comparaison entre les courbes expérimentale et théorique issue du modèle DAMMIN est représentée en figure 76 et donne une valeur d'accord entre les deux courbes de $\chi = 1,007$, montrant que les deux courbes sont très bien superposées.

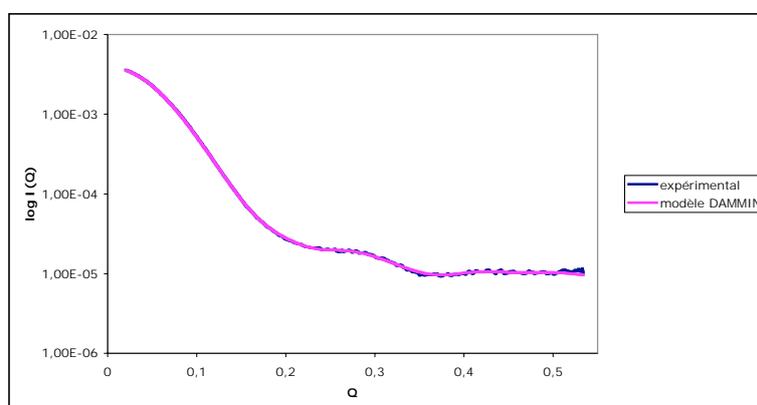


Figure 76 : Intensité de diffusion de PBP1b*. La courbe expérimentale est représentée en bleu et la courbe calculée à partir du modèle issu de DAMMIN est en rose.

Le modèle final issu de cette modélisation *ab initio* est présenté dans la figure 77. Il représente un volume de diamètre maximum de 89 Å en accord avec le D_{\max} calculé à partir de la fonction de distribution des paires $p(r)$ de 85 Å. Le rayon de giration de ce volume est de 25,8 Å en accord avec la détermination expérimentale de 25,9 Å.

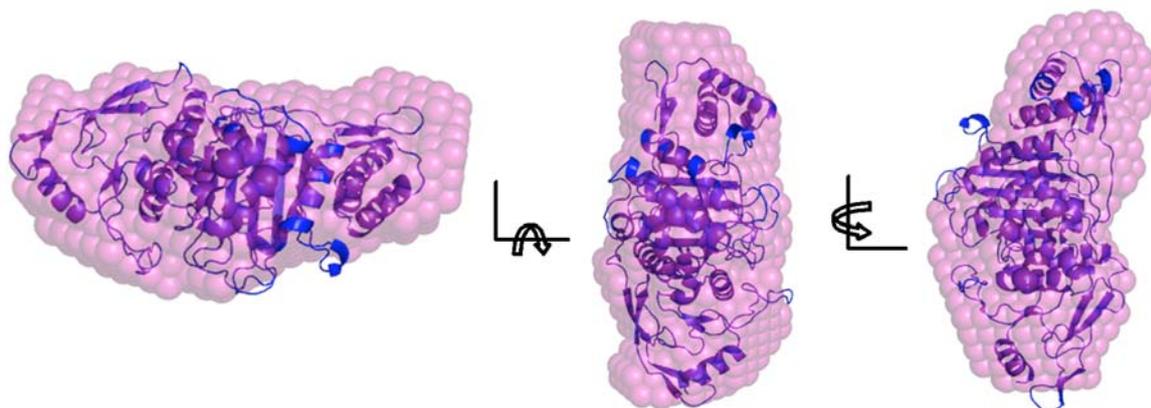


Figure 77 : modèle de PBP1b* obtenu avec le programme DAMMIN.

Les surfaces calculées par DAMMIN ont été construites avec des sphères de rayon 3,2 Å pour chaque résidu et sont en rose. La structure cristallographique de PBP1b*, superposée est en bleu. La vue du milieu correspond à une vue de face, celle de gauche à la rotation de 90° par rapport à l'axe horizontal et celle de droite à une rotation de 180° par rapport à l'axe vertical.

Lorsque nous superposons la structure cristallographique de PBP1b* avec le modèle issu de cette modélisation *ab initio*, nous pouvons remarquer que la structure à haute résolution est capable d'occuper convenablement le volume à basse résolution déterminé. Ce résultat nous permet d'apprécier la qualité de la méthode, car le volume déterminé à partir de la diffusion sur la protéine en solution correspond au volume occupé par la structure cristallographique. Ainsi, on peut estimer qu'il n'existe pas de modification majeure dans l'arrangement tridimensionnel global entre la structure cristalline et la structure en solution.

Modélisation ab initio de FL-PBP1b*

Comme indiqué précédemment lors de la modélisation de PBP1b*, nous avons réalisé dix modèles indépendants à partir du programme DAMMIN. Les valeurs de NSD entre les modèles oscillent entre 0,65 et 0,7, indiquant une bonne corrélation et donc une grande stabilité de la solution. Le volume correspondant à la superposition des 10 modèles est ensuite réinjecté dans un dernier cycle de DAMMIN.

La comparaison entre les courbes expérimentale et théorique issue du modèle DAMMIN est représentée figure 78 et donne une valeur d'accord entre les deux courbes de $\chi = 0,998$.

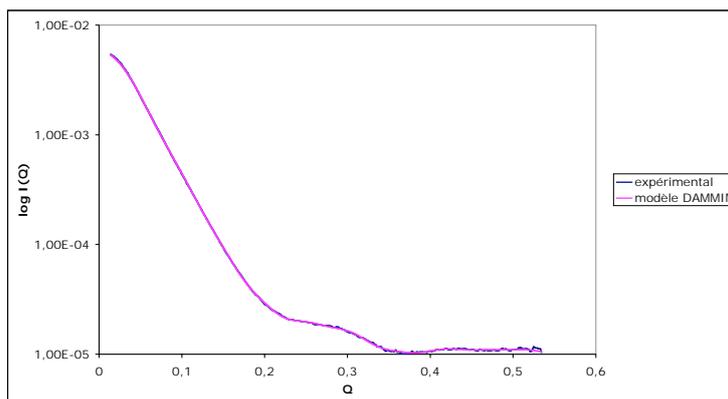


Figure 78 : Intensité de diffusion de FL-PBP1b*. La courbe expérimentale est représentée en bleu et la courbe calculée à partir du modèle issu de DAMMIN est en rose.

Le modèle final issu de cette modélisation *ab initio* est présenté dans la figure 79. Il représente un volume dont la plus grande dimension de 117 Å est en accord avec le D_{\max} calculé à partir de la fonction de distribution des paires $p(r)$ de 115 Å. Le rayon de giration de ce volume est de 35,5 Å en accord avec le rayon de giration calculé à partir des données de diffusion de 35,45 Å.

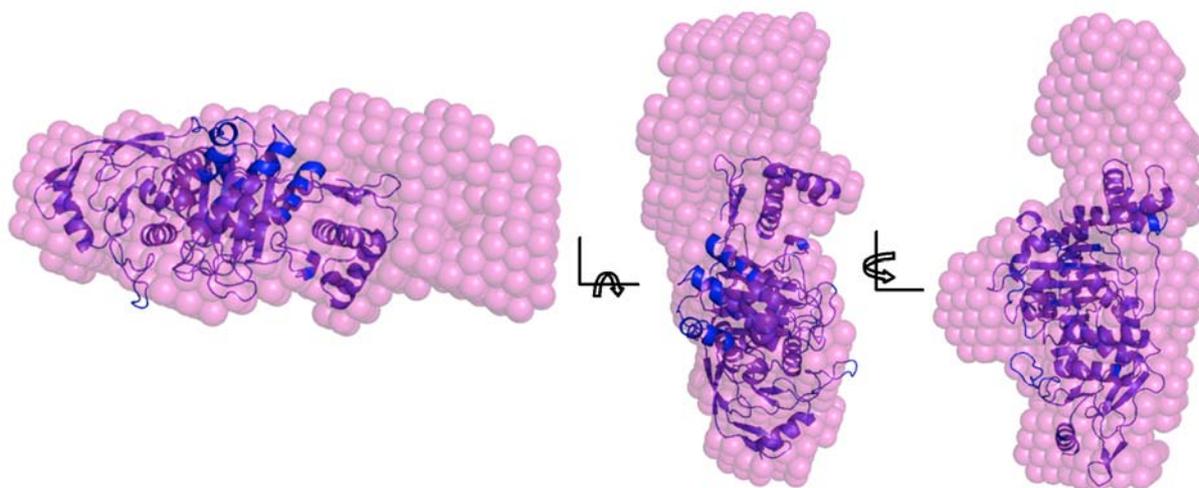


Figure 79 : Modèle de FL-PBP1b* obtenu avec le programme DAMMIN.

Les surfaces ont été construites avec des sphères de rayon 3,2 Å pour chaque résidu. Les trois vues correspondent à celles de la figure 75.

A partir de ce modèle, nous avons pu positionner la structure cristallographique de PBP1b* de façon à remplir correctement la densité. Il apparaît alors une densité supplémentaire susceptible de correspondre au domaine GT. En effet, cette portion non modélisée est placée au niveau de la région N-terminale de PBP1b* et est compatible avec le modèle que nous avons proposé dans le chapitre de résultats I.I.4. à propos du recouvrement du patch hydrophobe de la région de liaison.

Les contraintes de connectivité et de compacité de la solution imposées lors de la modélisation par DAMMIN impliquent que le modèle présenté dans la figure 79 montre un domaine replié et compact, avec le domaine supplémentaire très proche du domaine transpeptidase et de la région de liaison.

III.2.3. Modélisation à partir du modèle de PBP1b* par le programme CREDO

Dans une deuxième approche, nous avons utilisé les informations provenant de la structure cristallographique de PBP1b* pour enrichir la modélisation à basse résolution. Le programme CREDO (Petoukhov *et al.*, 2002) utilise un modèle à haute résolution, qu'il réduit à une succession de pseudo-résidus centrés sur la position de leurs carbones α . Ce modèle est maintenu fixe, puis le programme modélise sous la forme de pseudo-résidus le domaine manquant grâce à des cycles successifs de recuit simulé jusqu'à correspondance des courbes expérimentales et calculées. Chaque pseudo-résidu est séparé de celui qui le précède de 3,8 Å, ce qui correspond à la distance moyenne entre les carbones α au sein d'une structure de protéine. Des contraintes sont appliquées à la distribution des pseudo-résidus pour lui conférer les caractéristiques d'une chaîne polypeptidique compacte.

On réalise dix modélisations indépendantes par le programme CREDO et tous les domaines GT de ces modèles sont comparés deux à deux pour analyser leurs différences. Les valeurs de NSD pour tous ces modèles sont comprises entre 1,1 et 1,2 ce qui rend compte des formes globalement similaires des différents domaines GT selon les modèles considérés. Les valeurs de χ variant de 0,93 à 1,1 sont également la preuve d'une bonne adéquation entre les modèles et les données expérimentales ce qui est confirmé par les valeurs de R_g déterminées par le programme CRY SOL qui sont proches de la valeur expérimentale de 35,45 Å.

Trois différents modèles issus de la modélisation par CREDO sont présentés dans la figure 80.

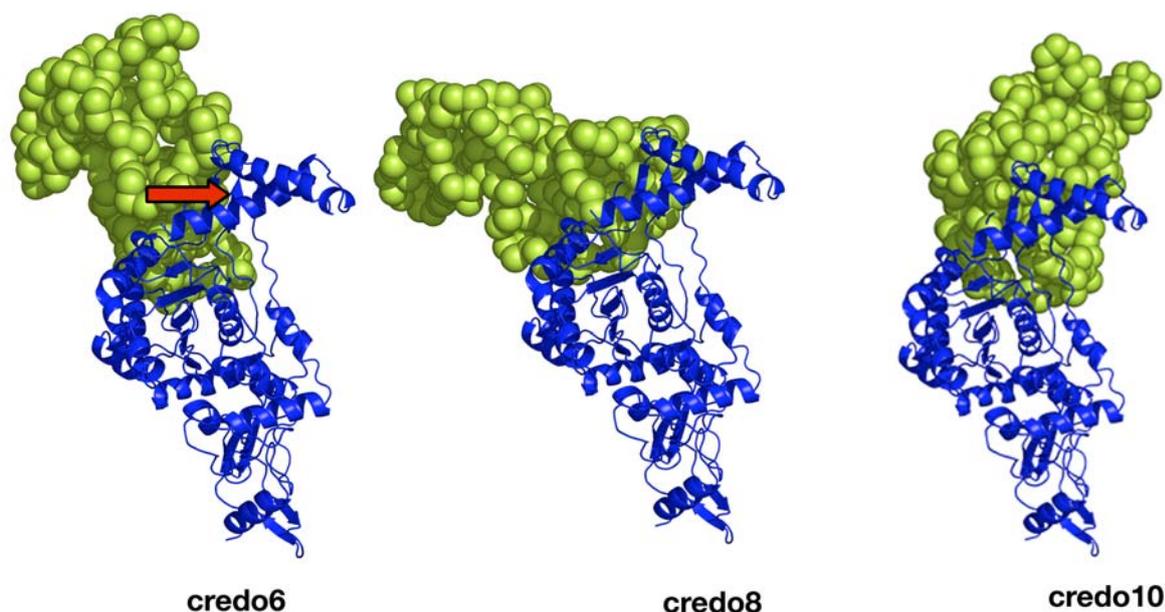


Figure 80 : Différents modèles de FL-PBP1b* obtenus avec le programme CREDO.

Les surfaces ont été construites avec des sphères de rayon 3,2 Å pour chaque résidu. La structure cristallographique de PBP1b* est en bleu et le domaine modélisé correspondant au domaine GT est en vert. La flèche rouge pointe vers le patch hydrophobe du domaine de liaison.

Ces différents modèles montrent la présence d'un domaine replié, positionné au niveau de la région N-terminale de PBP1b*. Celui-ci est situé à 90° par rapport au patch hydrophobe déterminé dans le chapitre I.I.4 et que nous avons prédit être la plate-forme d'accommodation du domaine GT (flèche rouge dans la figure 80). Les dix modèles calculés par CREDO montrent des degrés de compaction légèrement différents, révélés par les dimensions du domaine GT, allant de 55 à 75 Å dans sa plus grande longueur et de 28 à 43 Å dans la largeur. La distribution des domaines GT par rapport au domaine TP fixe est caractérisée par une distribution angulaire d'environ 70° entre les positions extrêmes.

Le fait que le programme CREDO impose des contraintes de connectivité et de compacité au modèle, implique que tous les modèles calculés ci-dessus représentent le domaine GT comme un domaine replié et compact. Ces modèles relativement similaires pourraient représenter une solution du problème, dans la mesure où la protéine est effectivement structurée.

III.2.4. Modélisation à partir du modèle de PBP1b* par le programme BUNCH

Une troisième approche a consisté à utiliser le programme BUNCH (Petoukhov and Svergun, 2005) pour modéliser le domaine GT. Ce programme utilise la même méthode que le programme CREDO précédent, en rajoutant l'information incluse dans les chaînes latérales de la structure cristallographique fixée. En effet, on détermine tout d'abord une courbe de diffusion théorique à partir de la structure cristallographique de PBP1b* ; la structure servira de modèle de départ à la modélisation du domaine manquant par un volume rempli de pseudo-résidus.

On réalise 16 modèles indépendants par le programme BUNCH, générés en imposant une connectivité et une compacité au domaine GT, ceci en fixant le R_g à 19 Å, valeur typique pour un domaine globulaire de 263 résidus. Les domaines GT de tous ces modèles sont ensuite comparés deux à deux pour analyser leurs différences. Les valeurs de NSD sont comprises entre 1,3 et 1,4, indiquant que les domaines GT sont similaires entre eux. Les valeurs de χ , comprises entre 0,9 et 1,2 traduisent l'excellent accord qu'il existe entre les différents modèles et les valeurs expérimentales, ce qui est confirmé par les valeurs des rayons de giration calculés par CRY SOL qui sont très proches du R_g expérimental.

Trois modèles issus de BUNCH sont présentés dans la figure 81.

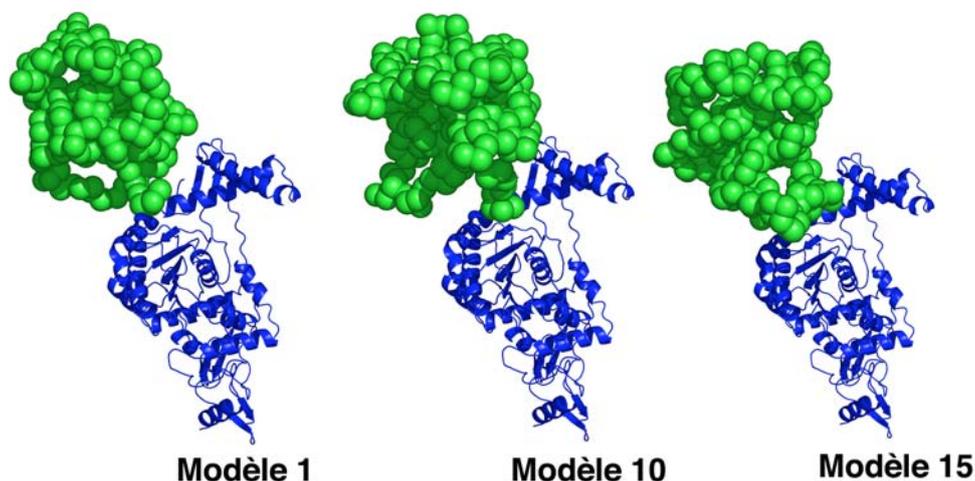


Figure 81 : Trois modèles de FL-PBP1b* obtenus avec le programme BUNCH réalisés avec une contrainte de compacité du domaine GT imposée.

La structure cristallographique est présentée en bleu et le domaine GT manquant est en vert. Les surfaces ont été construites avec des sphères de rayon 3,2 Å pour chaque résidu.

Cette procédure génère un domaine GT relativement compact de dimensions allant de 60 à 51 Å dans la longueur et de 39 à 56 Å dans la largeur selon les modèles. L'orientation du domaine GT varie légèrement selon les modèles considérés et peut se positionner soit légèrement devant, soit légèrement derrière la structure cristallographique selon l'orientation de la figure 81, correspondant à une désorientation d'environ 70° entre les positions extrêmes. Dans tous les cas, le domaine GT débute à partir de l'hélice Ha du domaine de liaison, inclut le peptide du GT « piégé » dans la structure cristallographique et se positionne de telle sorte qu'il est en interaction avec le patch hydrophobe de la région de liaison, préalablement déterminé.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé trois modèles en relâchant les contraintes qui imposaient un domaine GT compact, en imposant des rayons de giration successifs de 24 Å (modèle 16), 40 Å (modèle 17), ainsi qu'un modèle déterminé sans contrainte particulière de rayon de giration (modèle 18). Ces trois modèles sont représentés dans la figure 82.

Les courbes de diffusion calculées à partir de ces trois modèles correspondent très bien aux données expérimentales, avec des valeurs de χ allant de 0,91 pour le modèle 16 jusqu'à 0,74 pour le modèle 18.

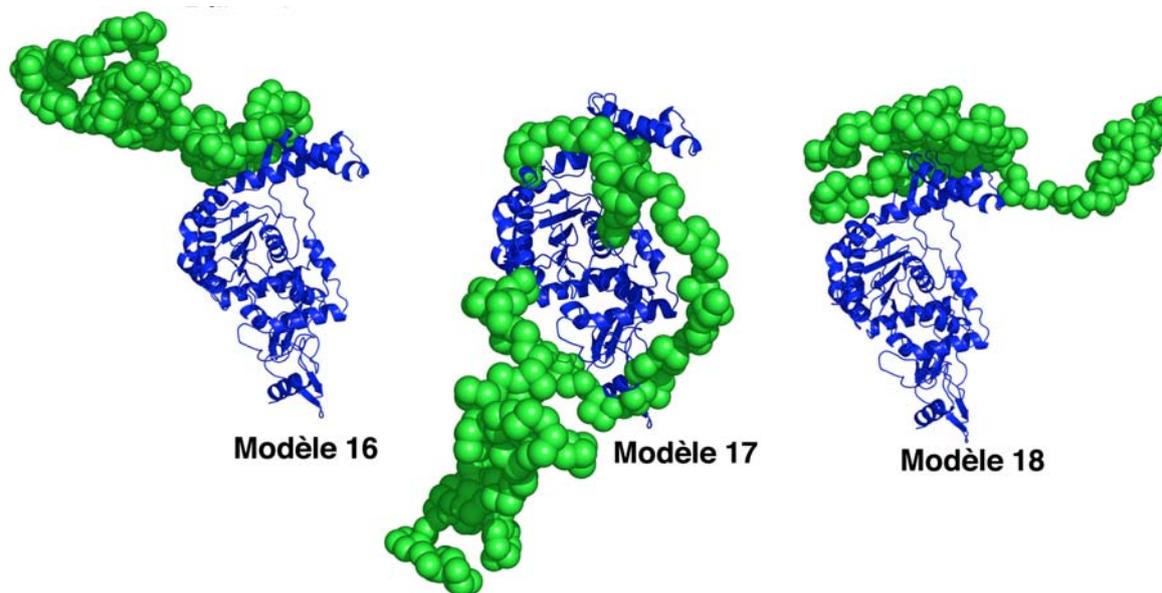


Figure 82 : Trois modèles de FL-PBP1b* obtenus avec le programme BUNCH réalisés en relâchant les contraintes de compacité du domaine GT.

La structure cristallographique est présentée en bleu et le domaine GT manquant est en vert.

Les surfaces ont été construites avec des sphères de rayon 3,2 Å pour chaque résidu. Le modèle 16 a été généré avec un rayon de giration de 24 Å, le modèle 17, avec un rayon de giration de 40 Å et le modèle 18, sans contrainte imposée au rayon de giration.

Les modèles 17 et 18 obtenus respectivement avec un rayon de giration de 40 Å et sans contrainte, montrent un domaine GT très étendu, partiellement déplié. Le modèle 17, bien qu'il soit en accord avec les données expérimentales, ne semble pas être en accord avec nos données biochimiques (chapitre III précédent). Il semble en effet peu probable qu'un domaine aussi déplié puisse être purifié sans subir une agrégation instantanée. Le modèle 18 possède une partie structurée suivie d'une partie déstructurée, qui pour les mêmes raisons que celles indiquées plus haut, ne semble pas être une solution biologiquement acceptable pour le repliement du domaine GT. En revanche, le modèle 16 obtenu en relâchant légèrement les contraintes de compacité du GT, présente un domaine plus étendu que ceux présentés dans la figure 81.

Il apparaît clairement, à partir de ces expériences de SAXS, qu'aucune conclusion sur la compacité du domaine GT ne peut être tirée de nos seules courbes de diffusion sur la protéine entière périplasmique. Les données ne contiennent pas assez d'information pour pouvoir trancher entre un modèle replié et compact et un modèle plus étendu, voire partiellement déstructuré.

A partir de l'ensemble de nos résultats, une image semble néanmoins se dégager. Le domaine GT exprimé seul semble être partiellement déstructuré comme le suggère les résultats de protéolyse spontanée du domaine GT_[74-321], malgré l'ajout d'anti-protéases. Il est envisageable que ce domaine exprimé seul puisse adopter une conformation dépliée similaire à celle présentée dans les modèles 17 ou 18. En revanche, le domaine GT exprimé en présence de la région de liaison entre les domaines GT et TP (clone AB05) et du domaine transpeptidase (clone AB06) est soluble et non agrégé. Ces résultats laissent imaginer qu'au sein de ces constructions, le domaine GT se positionne dans une conformation moins dépliée que celle du modèle 17, mais dans une conformation légèrement étendue comme celle montrée dans le modèle 16, montrant des zones partiellement déstructurées, dynamiques. Une structure étendue de la protéine entière périplasmique pourrait expliquer le fait que nous n'ayons jamais pu la cristalliser. La présence de l'hélice transmembranaire et/ou de partenaires protéiques pourrait être un des facteurs déclenchant le repliement compact du domaine GT.

Toutes ces hypothèses restent évidemment à tester et quelques suggestions d'expériences sont données dans le chapitre suivant.

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la lutte contre la résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque, notre but était double. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la structure tridimensionnelle du domaine transpeptidase d'une des PBP de classe A du pneumocoque, PBP1b.

Structure cristallographique de PBP1b* du pneumocoque et son implication dans le cycle cellulaire

De nombreux efforts de protéolyse, de mutagenèse dirigée et de cristallogénèse ont été fournis pour aboutir à la première structure du domaine transpeptidase d'une PBP de classe A. Cette structure révèle une organisation classique de son domaine catalytique central, commune aux PBP de classe B, aux PBP de faible poids moléculaire et aux transpeptidases solubles.

Un des résultats les plus étonnants de cette structure a été la découverte d'un phénomène de pré-activation de la molécule, révélée dans sa forme apoenzyme, par la présence du site actif de l'enzyme sous une forme fermée, inaccessible aux ligands. La pré-activation de la protéine grâce à un pseudo-substrat de la réaction, S2d, permet à la fois d'ouvrir la gorge catalytique et d'accommoder des antibiotiques de nature variée. Ce phénomène de potentialisation de PBP1b pose la question de son rôle dans la cellule. En effet, nous avons proposé que PBP1b existe sous une forme fermée, inaccessible aux ligands, dans les phases de latence de la division cellulaire, lorsque la synthèse de peptidoglycane n'est pas nécessaire. Lorsque sa participation devient indispensable, par l'approche d'un ligand ou de partenaires protéiques, son site actif s'ouvre pour la biosynthèse de la paroi (Macheboeuf *et al.*, 2005). Cette hypothèse est appuyée par le fait que PBP3 d'*E. coli* est acylée plus rapidement par des antibiotiques lors des phases de division cellulaire que pendant les phases de latence (Eberhardt *et al.*, 2003).

Le rôle précis de PBP1b reste encore à déterminer. En effet, sa localisation par immunofluorescence lors des différents stades de la division du pneumocoque ne permet pas d'attribuer un rôle à cette protéine puisqu'elle est soit localisée au niveau du site de septation, soit au niveau du site d'élongation suivant la cellule observée, mais jamais aux deux endroits de la même cellule (Morlot *et al.*, 2003). De plus, les nombreuses études cristallographiques concernant les PBP de classe B ou de faible poids moléculaire n'ont jamais révélé de conformation fermée de leur site actif, laissant imaginer que seule PBP1b puisse être présente dans une double conformation fonction de la phase de la division cellulaire. A partir de ces informations, il semble raisonnable d'imaginer un rôle de « PBP de secours » pour PBP1b.

Celle-ci serait, la plupart du temps, dans une conformation fermée au sein de la cellule, localisée soit au niveau du septum, soit au site d'élongation. Lorsque PBP1a ou PBP2a est inactivée par des antibiotiques, PBP1b serait capable d'ouvrir son site actif et de prendre la place de l'une d'elle dans le processus de division (Paik *et al.*, 1999). Le fait que PBP1b soit présente dans une conformation fermée dans toutes les structures que nous avons résolues en absence de S2d tend à confirmer cette hypothèse. D'autre part, il est important de préciser qu'aucune séquence de PBP1b mutante n'a été détectée dans les souches cliniques de pneumocoque résistants aux antibiotiques, ce qui conforte l'hypothèse de son implication dans un processus d'assistance en présence de stress aux antibiotiques.

La localisation de chaque PBP du pneumocoque dans toutes les situations de mutants de délétion pourrait permettre de préciser le rôle de PBP1b. En outre, les expériences de localisation des PBP par immunologie effectuées au sein du groupe ont toujours été réalisées sur une souche de pneumocoque de laboratoire, c'est-à-dire non encapsulée. Il serait intéressant de connaître les implications de chacune des PBP du pneumocoque sur la formation de la capsule. Pour cela, des expériences de microscopie électronique sur des souches encapsulées, possédant des délétions individuelles de PBP, pourraient être envisagées.

Complexes de PBP1b* avec de nouveaux inhibiteurs : un espoir pour la mise au point rationnelle d'un nouveau médicament

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé de nombreuses structures de complexes entre PBP1b* et des inhibiteurs de nature variée, certains de structure chimique connue, la nitrocéfine et la céfotaxime, jusqu'à de nouvelles molécules de type β -lactame et γ -lactame.

Les complexes avec des molécules de type β -lactame, mimant une partie du pentapeptide du pneumocoque ne laissent pas grand espoir quant au développement de molécules inhibitrices innovantes. En effet, l'ajout de chaînes latérales à des noyaux β -lactames classiques ne semblent être efficace que pour les transpeptidases solubles comme R61 de *Streptomyces*. En revanche, nous avons déterminé la première structure d'un complexe entre une PBP et deux molécules de type γ -lactame qui, elles, représentent un sérieux espoir pour le développement de nouveaux médicaments. Nous avons déterminé à la fois les structures des complexes covalents entre PBP1b* et ces molécules, les concentrations minimales inhibitrices sur différentes souches de pneumocoque avec différents degrés de résistance et les paramètres cinétiques d'acylation de FL-PBP1b*. Malgré une capacité

d'inhibition sérieuse observée pour l'analogue de la lactivicine, le TB-3-48, nous avons pu remarquer que ces deux molécules étaient soumises à un mécanisme de résistance allant dans le même sens que la résistance à la pénicilline. Il semble que ces molécules, dont le noyau principal a été modifié, soient moins efficaces contre les souches résistantes de pneumocoque. Il serait tout de même intéressant de déterminer les CMI sur des souches d'autres organismes tels que *S. aureus* à sensibilité variée pour les antibiotiques, pour évaluer de façon plus approfondie les mécanismes d'action de ces deux molécules. Il est primordial, à partir des informations structurales et bactériologiques présentées dans ce manuscrit, d'essayer d'optimiser ces composés de façon à réaliser de meilleurs inhibiteurs de PBP. La mise au point rationnelle de nouvelles molécules inhibitrices ne peut être réalisée que grâce à de nombreuses informations venant à la fois de structures cristallographiques, de données de modélisation moléculaire, de spectrométrie de masse, de cinétique enzymatique, de bactériologie et bien sûr, dans les cas favorables, de tests cliniques. La mise au point d'une nouvelle molécule à partir de nos données ne constitue qu'une des premières étapes du long processus qui aboutit à un médicament.

La création du consortium européen EUR-INTAFAR regroupant des biologistes, des enzymologistes, des structuralistes et des chimistes devrait permettre dans quelques années de découvrir une molécule permettant de lutter contre la progression toujours croissante de la résistance aux antibactériens. Pour cela, trois approches sont envisagées : d'une part, la modification des antibiotiques existants, c'est ce que nous avons développé précédemment et qui pourra être poursuivi par de nombreux cycles de modifications chimiques et analyses structurales en boucle. Une deuxième approche consiste à développer des molécules inhibant les PBP de façon non covalente ; c'est le travail que nous avons initié avec Chris Schofield et Delphine Fischer de l'Université d'Oxford, qui n'a pas encore à ce jour donné de résultat, mais qui mérite d'être approfondi. En effet, ces molécules ne ressemblant à aucune molécule connue ne devraient pas être susceptibles d'être soumises à des mécanismes de résistance et pourraient être utilisées soit comme antibiotiques seuls, soit dans une optique de bithérapie en couple avec une β -lactamine ou une γ -lactamine. Une troisième approche consiste en la mise en évidence de nouvelles cibles moléculaires et c'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés au domaine glycosyltransférase de PBP1b, en tant que cible potentielle pour la recherche de nouveaux inhibiteurs.

Etudes biochimiques d'une nouvelle cible pour l'antibiothérapie : le domaine glycosyltransférase des PBP

En étudiant les différentes structures cristallographiques de PBP1b*, nous avons tout d'abord remarqué que la partie N-terminale correspondant au domaine de liaison de la protéine était flexible. Nous avons alors imaginé que ce domaine pourrait agir comme une plate-forme capable d'accueillir le domaine GT et pouvant amener une certaine flexibilité entre les deux domaines. Les essais de cristallogenèse concernant la protéine périplasmique entière n'ayant jamais abouti, nous avons voulu travailler sur le domaine GT séparément. Ce domaine n'est malheureusement pas stable en solution et subit une forte agrégation au bout de quelques heures. Nous sommes parvenu à la conclusion que la protéine périplasmique entière requiert une stabilisation pour pouvoir être cristallisée.

Dans cette optique, nous avons tout d'abord utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre PBP1b qui, pour certains, ont montré la capacité à désagréger un domaine GT purifié seul. Cette approche constitue un espoir pour réduire la flexibilité entre les deux domaines TP et GT, et masquer les régions hydrophobes susceptibles de favoriser l'agrégation des protéines.

En poursuivant dans cette idée, il est possible d'envisager d'utiliser de nouvelles molécules dérivant du peptidoglycane qui permettraient de stabiliser les deux domaines et favoriser la cristallisation de la protéine périplasmique. Ces molécules sont en cours de synthèse ou de purification et pourront être utilisées d'ici peu pour tester cette hypothèse.

Des données enzymologiques concernant PBP1b d'*E. coli* ont permis de d'émettre l'idée que les PBP agiraient en tant que dimères. En effet, des données de mesures d'interactions par résonance plasmonique de surface sur la forme membranaire de PBP1b d'*E. coli*, ont permis d'établir une constante de dimérisation de l'ordre de 0,1 μ M favorisant clairement la formation d'un dimère en solution. De plus, la synthèse du peptidoglycane *in vitro* est favorisée en présence du dimère (Bertsche et al., 2005). La même expérience n'a pas été réalisée sur la même protéine en absence de l'hélice membranaire, mais il semble clair que la dimérisation est réalisée grâce à cette hélice. Le fait que la dimérisation améliore l'efficacité de synthèse du peptidoglycane peut être corrélée avec les résultats obtenus sur la forme périplasmique de PBP1a de *S. pneumoniae*, qui possède une efficacité d'acylation deux fois supérieures en présence de GST (Di Guilmi et al., 1998). La GST ayant tendance à dimériser, on peut concevoir que la différence d'efficacité d'acylation soit due à la présence ou non de dimère de PBP1a.

Si la stabilisation d'une PBP périplasmique ne se fait qu'avec l'interaction avec un partenaire protéique, ou un substrat, membranaire, et si les PBP dimérisent grâce à leur hélice transmembranaire, nous pouvons envisager que la cristallisation de la protéine entière ne pourra se faire qu'en travaillant avec la protéine entière. Ceci est une perspective envisageable, en particulier avec l'expertise que possède le Laboratoire des Protéines Membranaires dans ce domaine. Une alternative réside dans la construction d'une PBP dont l'hélice membranaire est remplacée par un « coiled-coil » artificiel de type GCN4 pour forcer la dimérisation et rendre la molécule soluble. Cette alternative a été utilisée en particulier dans la résolution de la structure trimérique de l'ectodomaine de la protéine gp414 du virus HIV (Weissenhorn et al., 1997). Cette approche est à ce jour au stade de l'élaboration de la construction en biologie moléculaire, mais constitue le meilleur espoir, à mon sens, de déterminer la structure à haute résolution d'un domaine GT d'une PBP.

Etude structurale du domaine glycosyltransférase par SAXS

Une meilleure compréhension de ce système a été obtenue grâce à la diffusion des rayons X aux petits angles sur la protéine entière périplasmique, nous permettant de représenter une enveloppe à basse résolution (12Å) du domaine GT. En revanche, il ne nous est pas possible de discriminer entre un modèle compact et un modèle partiellement déplié du GT et ceci en raison du manque d'information concernant la compacité de ce domaine.

Il pourra être envisagé de réaliser des spectres RMN avec un marquage ^{15}N sur les protéines PBP1b* et FL-PBP1b* ; ces spectres de type HSQC permettent d'attribuer un acide aminé à chaque pic de résonance. Les pics correspondant au domaine TP devraient être superposés dans les deux spectres et les pics de résonance supplémentaires éventuellement déterminés pour le spectre de FL-PBP1b* devraient être attribués au domaine GT. Dans le cas d'un domaine totalement déplié, nous devrions voir une accumulation de pics de résonance autour de 7 ppm, correspondant aux résonances des acides aminés libres en solution. Il faut cependant prendre en compte la taille de FL-PBP1b* de 78 kDa, qui pourrait être une limite dans la visualisation et l'attribution des pics de la protéine.

Nous pourrions également envisager de réaliser des expériences de diffusion aux petits angles sur une des constructions de GT, en particulier les constructions AB04 et AB05, contenant le domaine GT et la région de liaison pour déterminer le degré de compacité de ces domaines. Enfin, le degré de repliement du domaine GT pourrait être évalué en réalisant une protéolyse ménagée de ce domaine en utilisant plusieurs protéases et en réalisant la digestion à 4°C.

Pour finir nous proposons une hypothèse concernant le repliement du domaine GT au sein de la structure des PBP. Le domaine GT exprimé seul est dégradé par les protéases, il doit donc probablement être dans une conformation dépliée, favorisant l'agrégation entre les particules. Le domaine GT exprimé avec le domaine TP, pourrait adopter une conformation plus repliée que précédemment, mais avec une forme étendue, ne favorisant pas la cristallisation en raison d'une certaine mobilité entre les deux domaines et à l'intérieur de ce domaine. Enfin, le domaine GT au sein de la structure native, c'est-à-dire comprenant l'hélice transmembranaire, doit pouvoir se replier de façon compacte, éventuellement en présence de partenaires protéiques susceptibles de stabiliser la structure. Il semble donc que des études sur les PBP natives membranaires soient indispensables pour comprendre l'arrangement de ces protéines dans leur milieu naturel et pour comprendre leurs implications dans les processus de synthèse de la paroi bactérienne.

Références

A

- Aarsman, M.E., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T.M., Nguyen-Disteche, M. and den Blaauwen, T. (2005) Maturation of the Escherichia coli divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol*, **55**, 1631-1645.
- Abramson, J.S.e.a. (2000) Technical Reports : prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 2000, **106**, 367-376.
- Adachi, H., Ohta, T. and Matsuzawa, H. (1991) Site-directed mutants, at position 166, of RTEM-1 beta-lactamase that form a stable acyl-enzyme intermediate with penicillin. *J Biol Chem*, **266**, 3186-3191.
- Adam, M., Damblon, C., Jamin, M., Zorzi, W., Dusart, V., Galleni, M., el Kharroubi, A., Piras, G., Spratt, B.G., Keck, W., Coyette, J., Ghuysen, J.-M., Nguyen-Distèche, M. and Frère, J.-M. (1991) Acyltransferase activities of the high-molecular-mass essential penicillin-binding proteins. *Biochem.J.*, **279**, 601-604.
- Adam, M., Damblon, C., Plaitin, B., Christiaens, L. and Frère, J.-M. (1990) Chromogenic depsipeptide substrates for beta-lactamases and penicillin- sensitive DD-peptidases. *Biochem.J.*, **270**, 525-529.
- Adam, M., Fraipont, C., Rhazi, N., Nguyen-Disteche, M., Lakaye, B., Frère, J.-M., Devreese, B., Van Beeumen, J., van Heijenoort, Y., van Heijenoort, J. and Ghuysen, J.-M. (1997) The bimodular G57-V577 polypeptide chain of the class B penicillin- binding protein 3 of Escherichia coli catalyzes peptide bond formation from thioesters and does not catalyze glycan chain polymerization from the lipid II intermediate. *J.Bacteriol.*, **179**, 6005-6009.
- al-Obeid, S., Gutmann, L. and Williamson, R. (1990) Modification of penicillin-binding proteins of penicillin-resistant mutants of different species of enterococci. *J.Antimicrob.Chemother.*, **26**, 613-618.
- Anderson, J.W., Adediran, S.A., Charlier, P., Nguyen-Disteche, M., Frère, J.M., Nicholas, R.A. and Pratt, R.F. (2003) On the substrate specificity of bacterial DD-peptidases: evidence from two series of peptidoglycan-mimetic peptides. *Biochem J*, **373**, 949-955.
- Anderson, J.W. and Pratt, R.F. (2000) Dipeptide binding to the extended active site of the *Streptomyces* R61 D-alanyl-D-alanine peptidase: the path to a specific substrate. *Biochemistry*, **39**, 12200-12209.
- Andersson, B., Dahmen, J., Frejd, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G. and Eden, C.S. (1983) Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J Exp Med*, **158**, 559-570.
- Arthur, M. and Courvalin, P. (1993) Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, **37**, 1563-1571.
- Arthur, M., Depardieu, F., Cabanie, L., Reynolds, P. and Courvalin, P. (1998) Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.*, **30**, 819-830.
- Asahi, Y. and Ubukata, K. (1998) Association of a Thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2267-2273.
- Austrian, R. (1981) Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev Infect Dis*, **3 Suppl**, S1-17.

Ayala, J., Goffin, C., Nguyen-Disteche, M. and Ghuysen, J.M. (1994) Site-directed mutagenesis of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*: role of Val-545. *FEMS.Microbiol.Lett.*, **121**, 251-256.

B

Baldwin, J.E., Lynch, G.P. and Pitlik, J. (1991) γ -Lactam analogues of β -lactam antibiotics. *The Journal of antibiotics*, **44**, 1-24.

Barrett, D., Leimkuhler, C., Chen, L., Walker, D., Kahne, D. and Walker, S. (2005) Kinetic characterization of the glycosyltransferase module of *Staphylococcus aureus* PBP2. *J Bacteriol*, **187**, 2215-2217.

Barrett, D.S., Chen, L., Litterman, N.K. and Walker, S. (2004) Expression and characterization of the isolated glycosyltransferase module of *Escherichia coli* PBP1b. *Biochemistry*, **43**, 12375-12381.

Basu, J., Mahapatra, S., Kundu, M., Mukhopadhyay, S., Nguyen Disteche, M., Dubois, P., Joris, B., Van Beeumen, J., Cole, S.T., Chakrabarti, P. and Ghuysen, J.M. (1996) Identification and overexpression in *Escherichia coli* of a *Mycobacterium leprae* gene, *pon1*, encoding a high-molecular-mass class A penicillin-binding protein, PBP1. *J.Bacteriol.*, **178**, 1707-1711.

Bertsche, U., Breukink, E., Kast, T. and Vollmer, W. (2005) In vitro murein (peptidoglycan) synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1b from *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.*, **280**, 38096-38101.

Beveridge, T.J. (1981) Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Int Rev Cytol*, **72**, 229-317.

Bi, E.F. and Lutkenhaus, J. (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature Struct.Biol.*, **354**, 161-164.

Bi, E.F. and Lutkenhaus, J. (1992) Isolation and characterization of *ftsZ* alleles that affect septal morphology. *J. Bacteriol.*, **174**, 5414-5423.

Birck, C., Cha, J.Y., Cross, J., Schulze-Briese, C., Meroueh, S.O., Schlegel, H.B., Mobashery, S. and Samama, J.P. (2004) X-ray crystal structure of the acylated beta-lactam sensor domain of BlaR1 from *Staphylococcus aureus* and the mechanism of receptor activation for signal transduction. *J Am Chem Soc*, **126**, 13945-13947.

Botta, G.A. and Park, J.T. (1981) Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol*, **145**, 333-340.

Bouhss, A., Crouvoisier, M., Blanot, D. and Mengin-Lecreulx, D. (2004) Purification and characterization of the bacterial *MraY* translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 29974-29980.

Bramhill, D. (1997) Bacterial cell division. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **13**, 395-424.

Braun, V., Gnirke, H., Henning, U. and Rehn, K. (1973) Model for the structure of the shape-maintaining layer of the *Escherichia coli* cell envelope. *J Bacteriol*, **114**, 1264-1270.

Breukink, E. and de Kruijff, B. (2006) Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 321-332.

Breukink, E., van Heusden, H.E., Vollmerhaus, P.J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A.J. and de Kruijff, B. (2003) Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J Biol Chem*, **278**, 19898-19903.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson,

- T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.*, **D54**, 905-921.
- Buddelmeijer, N. and Beckwith, J. (2004) A complex of Escherichia coli cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol. Microbiol.*, **52**, 1315-1327.
- Bush, K., Macielag, M. and Weidner-Wells, M. (2004) Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond Phase 1. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 466-476.

C

- Cao, Y., Musah, R., Wilcox, S., Goodin, D. and McRee, D. (2006) Protein conformer selection by ligand binding observed with crystallography. *Protein science*.
- Carapito, R., Chesnel, L., Vernet, T. and Zapun, A. (2005) Pneumococcal β -lactam resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x. *J. Biol. Chem.*, e-print.
- Carfi, A., Parès, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C., Frère, J.M. and Dideberg, O. (1995) The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase reveals a new type of protein fold. *EMBO J.*, **14**, 4914-4921.
- Casal, J. (1982) Antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.*, **22**, 222-225.
- CCP4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D.*, **50**, 760-763.
- Chalkley, L., Schuster, C., Potgieter, E. and Hakenbeck, R. (1991) Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and *Viridans* streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **69**, 35-42.
- Chambers, H.F. (2001) The changing epidemiology of Staphylococcus aureus? *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 178-182.
- Chambers, H.F. (2005) Evaluation of ceftobiprole in a rabbit model of aortic valve endocarditis due to methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 884-888.
- Chambers, H.F., Turner, J., Schechter, G.F., Kawamura, M. and Hopewell, P.C. (2005) Imipenem for treatment of tuberculosis in mice and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 2816-2821.
- Chen, L., Walker, D., Sun, B., Hu, Y., Walker, S. and Kahne, D. (2003) Vancomycin analogues active against vanA-resistant strains inhibit bacterial transglycosylase without binding substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5658-5663.
- Chen, Y., Shoichet, B. and Bonnet, R. (2005) Structure, function, and inhibition along the reaction coordinate of CTX-M beta-lactamases. *J Am Chem Soc*, **127**, 5423-5434.
- Chesnel, L., Pernot, L., Lemaire, D., Champelovier, D., Croize, J., Dideberg, O., Vernet, T. and Zapun, A. (2003) The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from Streptococcus pneumoniae further decreases the susceptibility to beta-lactams of resistant strains. *J. Biol. Chem.*, **278**, 44448-44456.
- Coffey, T.J., Daniels, M., McDougal, L.K., Dowson, C.G., Tenover, F.C. and Spratt, B.G. (1995) Genetic analysis of clinical isolates of Streptococcus pneumoniae with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1306-1313.

- Contreras-Martel, C., Job, V., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., Dideberg, O. and Dessen, A. (2005) Crystal structure of Penicillin-Binding Protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.*
- Coulthurst, S.J., Barnard, A.M.L. and Salmond, G.P.C. (2005) Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. *Nature Rev. Microbiol.*, **on line**.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. and Henrissat, B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, **328**, 307-317.

D

- Davies, C., White, S.W. and Nicholas, R.A. (2001) Crystal structure of a deacylation-defective mutant of penicillin-binding protein 5 at 2.3-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **276**, 616-623.
- de Pedro, M.A., Donachie, W.D., Holtje, J.V. and Schwarz, H. (2001) Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein 2. *J. Bacteriol.*, **183**, 4115-4126.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M.E., Vischer, N.O. and Nanninga, N. (2003) Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Mol. Microbiol.*, **47**, 539-547.
- Den Blaauwen, T., Buddelmeijer, N., Aarsman, M.E., Hameete, C.M. and Nanninga, N. (1999) Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **181**, 5167-5175.
- Denome, S.A., Elf, P.K., Henderson, T.A., Nelson, D.E. and Young, K.D. (1999) *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.*, **181**, 3981-3993.
- Dessen, A., Mouz, N., Gordon, E., Hopkins, J. and Dideberg, O. (2001) Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45106-45112.
- Di Bernardino, M., Dijkstra, A., Stuber, D., Keck, W. and Gubler, M. (1996) The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. *FEBS Lett*, **392**, 184-188.
- Di Guilmi, A.M. and Dessen, A. (2002) New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep*, **3**, 728-734.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2002) Bifunctional penicillin-binding proteins: focus on the glycosyltransferase domain and its specific inhibitor moenomycin. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **3**, 63-75.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2003a) Functional characterization of penicillin-binding protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **185**, 1650-1658.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2003b) The glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* catalyzes the polymerization of murein glycan chains. *J Bacteriol*, **185**, 4418-4423.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Andrieu, J.P., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Gagnon, J., Dideberg, O. and Vernet, T. (1998) Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 1a. *J. Bacteriol.*, **180**, 5652-5659.
- Di Guilmi, A.M., Mouz, N., Martin, L., Hoskins, J., Jaskunas, S.R., Dideberg, O. and Vernet, T. (1999) Glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* is membrane associated. *J. Bacteriol.*, **181**, 2773-2781.

- Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J.P., Dehottay, P., Dusart, J., Erpicum, T., Frère, J.M. and Ghuysen, J.M. (1987) The crystal structure of the beta-lactamase of *Streptomyces albus* G at 0.3 nm resolution. *Biochem J*, **245**, 911-913.
- Dideberg, O., Vernet, T. and Mouz, N. (2003) Mini-proteine PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* et utilisations correspondantes. France.
- DiMasi, J.A., Hansen, R.W. and Grabowski, H.G. (2003) The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ*, **22**, 151-185.
- Dmitriev, B., Toukach, F. and Ehlers, S. (2005) Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends Microbiol*, **13**, 569-574.
- Dmitriev, B.A., Ehlers, S. and Rietschel, E.T. (1999) Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)*, **187**, 173-181.
- Dmitriev, B.A., Ehlers, S., Rietschel, E.T. and Brennan, P.J. (2000) Molecular mechanics of the mycobacterial cell wall: from horizontal layers to vertical scaffolds. *Int J Med Microbiol*, **290**, 251-258.
- Dmitriev, B.A., Toukach, F.V., Schaper, K.J., Holst, O., Rietschel, E.T. and Ehlers, S. (2003) Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. *J Bacteriol*, **185**, 3458-3468.
- Dowson, C.G., Hutchison, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Smith, J.M. and Spratt, B.G. (1989) Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **86**, 8842-8846.
- du Plessis, M., Bingen, E. and Klugman, K.P. (2002) Analysis of penicillin-binding protein genes of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibility to amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2349-2357.
- Du Plessis, M., Smith, A.M. and Klugman, K.P. (2000) Analysis of penicillin-binding protein 1b and 2a genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, **6**, 127-131.
- Duval, V., Swinnen, M., Lepage, S., Brans, A., Granier, B., Franssen, C., Frere, J.M. and Joris, B. (2003) The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of beta-lactamase synthesis. *Mol Microbiol*, **48**, 1553-1564.
- Du Vigneaud, V. and Carpenter, F. (1949) The γ -lactam of benzylhomopenicilloic acid and related compounds. In Clarke, H. and al., e. (eds.), *The Chemistry of Penicillin*. Princeton University Press, pp. 1004-1017.

E

- Eberhard, T., Kronvall, G. and Ullberg, M. (1999) Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog*, **26**, 175-181.
- Eberhardt, C., Kuerschner, L. and Weiss, D.S. (2003) Probing the catalytic activity of a cell division-specific transpeptidase *in vivo* with beta-lactams. *J. Bacteriol.*, **185**, 3726-3734.
- Eichelberger, U., Neundorff, I., Hennig, L., Findeisen, M., Giesa, S., Muller, D. and al., e. (2002) Synthesis of analogues of the 2-O-alkyl glycerate part of the moenomycins. *Tetrahedron*, **3**, 545-559.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 2126-2132.

- Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. and Spratt, B.G. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 7687-7692.
- Errington, J., Daniel, R.A. and Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **67**, 52-65.
- Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M.K., Hughes, C. and Koronakis, V. (2004) Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 741-747.

F

- Figge, R.M., Divakaruni, A.V. and Gober, J.W. (2004) MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, coordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.*, **51**, 1321-1332.
- Filipe, S.R. and Tomasz, A. (2000) Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall mucopeptide branching genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4891-4896.
- Fontana, R., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lopez, H., Sucari, A. and Satta, G. (1994) Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 1980-1983.
- Fonzé, E., Vermeire, M., Nguyen-Disteche, M., Basseur, R. and Charlier, P. (1999) The crystal structure of a penicilloyl-serine transferase of intermediate penicillin sensitivity. The DD-transpeptidase of *Streptomyces* K15. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21853-21860.
- Fraipont, C., Sapunarcic, F., Zervosen, A., Auger, G., Devreese, B., Lioux, T., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., Herdewijn, P., Van Beeumen, J., Frère, J.M. and Nguyen-Disteche, M. (2006) Glycosyl transferase activity of the *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1b: specificity profile for the substrate. *Biochemistry*, **45**, 4007-4013.
- Frère, J.M., Ghuysen, J., Degelaen, J., Loffet, A. and Perkins, H.R. (1975a) Fragmentation of benzylpenicillin after interaction with the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidases of *Streptomyces* R61 and R39. *Nature*, **258**, 168-170.
- Frère, J.M., Ghuysen, J., Vanderhaeghe, H., Adriaens, P., Degelaen, J. and De Graeve, J. (1976) Fate of thiazolidine ring during fragmentation of penicillin by exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase of *Streptomyces* R61. *Nature*, **260**, 451-454.
- Frère, J.M., Ghuysen, J.M. and Iwatsubo, M. (1975) Kinetics of interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and beta-lactam antibiotics. A choice of models. *Eur J Biochem*, **57**, 343-351.
- Frère, J.M., Ghuysen, J.M. and Iwatsubo, M. (1975b) Kinetics of interaction between the exocellular DD-carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and beta-lactam antibiotics. A choice of models. *Eur J Biochem*, **57**, 343-351.
- Fritsche, T.R., Stilwell, M.G. and Jones, R.N. (2005) Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report. *Clin. Microbiol. Infect.*, **11**, 974-984.

G

- Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, J.M. and Dideberg, O. (2005) A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J. Mol. Biol.*, **345**, 785-795.

- Garcia-Bustos, J. and Tomasz, A. (1990) A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**, 5415-5419.
- Garcia-Bustos, J.F., Chait, B.T. and Tomasz, A. (1987) Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. *J. Biol. Chem.*, **262**, 15400-15405.
- Garcia-Castellanos, R., Mallorqui-Fernandez, G., Marrero, A., Potempa, J., Coll, M. and Gomis-Ruth, F.X. (2004) On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with its operator. *J Biol Chem*, **279**, 17888-17896.
- Geelen, S., Bhattacharyya, C. and Tuomanen, E. (1993) The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun*, **61**, 1538-1543.
- Geslin, P., Buu-Hoi, A., Fremaux, A. and Acar, J.F. (1992) Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an epidemiological survey in France, 1970-1990. *Clin Infect Dis*, **15**, 95-98.
- Ghuysen, J.M. (1994) Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Trends Microbiol.*, **2**, 372-380.
- Glatter, O. (1977) A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*, **10**, 415-421.
- Glauner, B., Holtje, J.V. and Schwarz, U. (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **263**, 10088-10095.
- Goffin, C. and Ghuysen, J.M. (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1079-1093.
- Goffin, C. and Ghuysen, J.M. (2002) Biochemistry and comparative genomics of SXXK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 702-738.
- Gordon, E., Mouz, N., Duée, E. and Dideberg, O. (2000) The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J. Mol. Biol.*, **299**, 501-509.
- Gueiros-Filho, F.J. and Losick, R. (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.*, **16**, 2544-2556.
- Guillaume, G., Vanhove, M., Lamotte-Brasseur, J., Ledent, P., Jamin, M., Joris, B. and Frère, J.M. (1997) Site-directed mutagenesis of glutamate 166 in two β -lactamases. Kinetic and molecular modeling studies. *J Biol Chem*, **272**, 5438-5444.
- Gutmann, L., Vincent, S., Billot-Klein, D., Acar, J.F., Mrena, E. and Williamson, R. (1986) Involvement of penicillin-binding protein 2 with other penicillin-binding proteins in lysis of *Escherichia coli* by some β -lactam antibiotics alone and in synergistic lytic effect of amdinocillin (mecillinam). *Antimicrob Agents Chemother*, **30**, 906-912.

H

- Hakenbeck, R., Grebe, T., Z#hner, D. and Stock, J.B. (1999) β -Lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol*, **33**, 673-678.
- Hakenbeck, R., Konig, A., Kern, I., van der Linden, M., Keck, W., Billot-Klein, D., Legrand, R., Schoot, B. and Gutmann, L. (1998) Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level β -lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, **180**, 1831-1840.

- Hakenbeck, R., Martin, C., Dowson, C. and Grebe, T. (1994) Penicillin-binding protein 2b of *Streptococcus pneumoniae* in piperacillin-resistant laboratory mutants. *J. Bacteriol.*, **176**, 5574-5577.
- Hakenbeck, R., Tornette, S. and Adkinson, N.F. (1987) Interaction of non-lytic β -lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 755-760.
- Halliday, J., McKeveney, D., Muldoon, C., Rajaratnam, P. and Meutermans, W. (2006) Targeting the forgotten transglycosylases. *Biochem Pharmacol*, **71**, 957-967.
- Harada, S., Tsubotani, S., Hida, T., Koyama, K., Kondo, M. and Ono, H. (1988) Chemistry of a new antibiotic: Lactivicin. *Tetrahedron Letter*, **44**, 6589-6606.
- Harada, S., Tsubotani, S., Katayama, N., Hida, T., Ono, H. and Okazaki, H. (1986) Structure of lactivicin, an antibiotic having a new nucleus and similar biological activities to β -lactam antibiotics. *Tetrahedron Letter*, **27**, 6229-6232.
- Hebeisen, P., Heinze-Krauss, I., Angehrn, P., Hohl, P., Page, M.G. and Then, R.L. (2001) In vitro and in vivo properties of Ro 63-9141, a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 825-836.
- Heffron, R. (1939) The Commonwealth Fund, New York, N.Y.
- Henrichsen, J. (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, **33**, 2759-2762.
- Herzberg, O. and Moulton, J. (1987) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å resolution. *Science*, **236**, 694-701.
- Higgins, M.K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. (2004) Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9994-9999.
- Höltje, J.V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 181-203.
- Hoskins, J., Matsushima, P., Mullen, D.L., Tang, J., Zhao, G., Meier, T.I., Nicas, T.I. and Jaskunas, S.R. (1999) Gene disruption studies of Penicillin-Binding Proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **181**, 6552-6555.
- Huber, G. and Neesemann, G. (1968) Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **30**, 7-13.

I

- Isaac, L. and Ware, G. (1974) The flexibility of bacterial cell walls. *J. Appl. Bacteriol.*, **37**, 335-339.
- Ishino, F. and Matsushashi, M. (1981) Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum-forming reaction sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, **101**, 905-911.
- Ishino, F., Mitsui, K., Tamaki, S. and Matsushashi, M. (1980) Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A. *Biochem Biophys Res Commun*, **97**, 287-293.

J

- Jacobo-Molina, A., Clark, A.D., Jr., Williams, R.L., Nanni, R.G., Clark, P., Ferris, A.L., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1991) Crystals of a ternary complex of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with a monoclonal antibody Fab fragment and double-stranded DNA diffract x-rays to 3.5-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10895-10899.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, P. and et al. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6320-6324.
- Jacobs, M.R., Koornhof, H.J., Robins-Browne, R.M., Stevenson, C.M., Vermaak, Z.A., Freiman, I., Miller, G.B., Witcomb, M.A., Isaacson, M., Ward, J.I. and Austrian, R. (1978) Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med*, **299**, 735-740.
- Jamin, M., Adam, M., Damblon, C., Christiaens, L. and Frère, J.M. (1991) Accumulation of acyl-enzyme in DD-peptidase-catalysed reactions with analogues of peptide substrates. *Biochem J*, **280 (Pt 2)**, 499-506.
- Jamin, M., Damblon, C., Millier, S., Hakenbeck, R. and Frère, J.-M. (1993) Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae* : enzymic activities and interactions with β -lactams. *Biochem. J.*, **292**, 735-741.
- Jones, C. (1998) Capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Carbohydr. Eur.*, **21**, 10-16.

K

- Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 795-800.
- Katayama, Y., Zhang, H.Z. and Chambers, H. (2004) PBP2a mutations producing very high level resistance to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 453-459.
- Kato, J., Suzuki, H. and Hirota, Y. (1985) Dispensability of either penicillin-binding protein-1a or -1b involved in the essential process for cell elongation in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **200**, 272-277.
- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganes, T.S. and Spratt, B.G. (1993) Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **106**, 171-175.
- Kerff, F., Charlier, P., Colombo, M.L., Sauvage, E., Brans, A., Frère, J.M., Joris, B. and Fonce, E. (2003) Crystal structure of the sensor domain of the BlaR penicillin receptor from *Bacillus licheniformis*. *Biochemistry*, **42**, 12835-12843.
- Kishida, H., Unzai, S., Roper, D.I., Lloyd, A., Park, S.Y. and Tame, J.R. (2006) Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics. *Biochemistry*, **45**, 783-792.
- Klugman, K.P. (1990) Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev*, **3**, 171-196.
- Kobayashi, R., Konomi, M., Hasegawa, K., Morozumi, M., Sunakawa, K. and Ubukata, K. (2005) In vitro activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic against penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 889-894.
- Koch, A. and Woeste, S. (1992) Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **174**, 4811-4819.
- Kohlrausch, U. and Holtje, J.V. (1991) Analysis of murein and murein precursors during antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **173**, 3425-3431.

- Konarev, P., Volkov, V., Sokolova, A., Koch, M. and Svergun, D.I. (2003) PRIMUS : a windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, **36**, 1277-1282.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, **405**, 914-919.
- Kozin, M.B. and Svergun, D.I. (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography*, **34**, 33-41.
- Krauss, J., van der Linden, M., Grebe, T. and Hakenbeck, R. (1996) Penicillin-binding proteins 2x and 2b as primary PBP targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.*, **2**, 183-186.
- Kumar, I. and Pratt, R.F. (2005a) Transpeptidation reactions of a specific substrate catalyzed by the streptomyces R61 DD-peptidase: characterization of a chromogenic substrate and acyl acceptor design. *Biochemistry*, **44**, 9971-9979.
- Kumar, I. and Pratt, R.F. (2005b) Transpeptidation reactions of a specific substrate catalyzed by the *Streptomyces* R61 DD-peptidase: the structural basis of acyl acceptor specificity. *Biochemistry*, **44**, 9961-9970.

Ł

- Labischinski, H., Goodell, E.W., Goodell, A. and Hochberg, M.L. (1991) Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study. *J Bacteriol*, **173**, 751-756.
- Labischinski, H., H. (1994) Bacterial peptidoglycan : Overview and evolving concepts. In Elsevier (ed.), *Bacterial cell wall*. Ghuyssen, JM and Hackenback, R., Amsterdam, pp. 23-39.
- Laible, G., Spratt, B.G. and Hakenbeck, R. (1991) Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 1993-2002.
- Lee, W., McDonough, M.A., Kotra, L.P., Li, Z.H., Silvaggi, N.R., Takeda, Y., Kelly, J.A. and Mobashery, S. (2001) A 1.2-Å snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1427-1431.
- Lefevre, F., Remy, M.H. and Masson, J.M. (1997) Topographical and functional investigation of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1b by alanine stretch scanning mutagenesis. *J Bacteriol*, **179**, 4761-4767.
- Lessard, I.A. and Walsh, C.T. (1999) Mutational analysis of active site residues of the enterococcal D-ala-D-ala dipeptidase Van X and comparison with *Escherichia coli* D-ala-D-ala ligase and D-ala-D-ala carboxypeptidase VanY. *Chem. Biol.*, **6**, 177-187.
- Levine, M., Woodrow, G.C., Kaper, J.B., Cobon, G.S. (1997) *Conjugate Vaccines against Streptococcus pneumoniae*, New York, N.Y.
- Levy, D.e.a. (1998) Épidémiologie de la flore nasopharyngée au cours des otites moyennes aiguës de l'enfant en 1997. *Méd. Mal. Infect.*, **28**, 8-22.
- Leyh-Bouille, M., Coyette, J., Ghuyssen, J.M., Idczak, J., Perkins, H.R. and Nieto, M. (1971) Penicillin-sensitive DD-carboxypeptidase from *Streptomyces* strain R 61. *Biochemistry*, **10**, 2163-2170.
- Lim, D. and Strynadka, N.C. (2002) Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 870-876.
- Lobkovsky, E., Moews, P.C., Liu, H., Zhao, H., Frère, J.M. and Knox, J.R. (1993) Evolution of an enzyme activity: crystallographic structure at 2Å resolution of cephalosporinase

- from the ampC gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11257-11261.
- Lovering, A.L., De Castro, L., Lim, D. and Strynadka, N.C. (2006) Structural analysis of an "open" form of PBP1B from *Streptococcus pneumoniae*. *Protein Sci*, **15**, 1701-1709.

M

- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O. and Dessen, A. (2006) Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*, **30**, 673-691.
- Macheboeuf, P., Di Guilmi, A.M., Job, V., Vernet, T., Dideberg, O. and Dessen, A. (2005) Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 577-582.
- MacLeod, C.M., Hodges, R.G., Heidelberger, M., and Bernhard, W.G. (1945) Prevention of pneumococcal pneumoniae by immunization with specific capsular polysaccharides. *J. Exp. Med.*, **82**, 445-465.
- Mahapatra, S., Bhakta, S., Ahamed, J. and Basu, J. (2000) Characterization of derivatives of the high-molecular-mass penicillin-binding protein (PBP) 1 of *Mycobacterium leprae*. *Biochem J*, **350 Pt 1**, 75-80.
- Mainardi, J.L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J.E., Dubost, L., Brouard, J.P., Ouazzani, J., Rice, L.B., Gutmann, L. and Arthur, M. (2005) A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *J Biol Chem*, **280**, 38146-38152.
- Mainardi, J.L., Legrand, R., Arthur, M., Schoot, B., van Heijenoort, J. and Gutmann, L. (2000) Novel mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem*, **275**, 16490-16496.
- Mainardi, J.L., Morel, V., Fourgeaud, M., Cremniter, J., Blanot, D., Legrand, R., Frehel, C., Arthur, M., Van Heijenoort, J. and Gutmann, L. (2002) Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem*, **277**, 35801-35807.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. In Laboratory, C.S.H. (ed.).
- Marton, A., Gulyas, M., Munoz, R. and Tomasz, A. (1991) Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J Infect Dis*, **163**, 542-548.
- Matias, V.R. and Beveridge, T.J. (2005) Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Mol Microbiol*, **56**, 240-251.
- Matias, V.R. and Beveridge, T.J. (2006) Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **188**, 1011-1021.
- Matsushashi, M., Wachi, M. and Ishino, F. (1990) Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Res Microbiol*, **141**, 89-103.
- McDonough, M., Anderson, J., Silvaggi, N., Pratt, R., Knox, J. and Kelly, J. (2002) Structures of two kinetic intermediates reveal species specificity of penicillin-binding proteins. *J. Mol. Biol.*, **322**, 111.

- McDougal, L.K., Rasheed, J.K., Biddle, J.W. and Tenover, F.C. (1995) Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 2282-2288.
- McPherson, A., Malkin, A.J. and Kuznetsov, Y.G. (1995) The science of macromolecular crystallization. *Structure*, **3**, 759-768.
- Meroueh, S.O., Bencze, K.Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J.F., Stemmler, T.L. and Mobashery, S. (2006) Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4404-4409.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoie, M., Zapun, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2004) The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **51**, 1641-1648.
- Morlot, C., Pernot, L., Le Gouellec, A., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., Dideberg, O. and Dessen, A. (2005) Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, **280**, 15984-15991.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O. and Vernet, T. (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol. Microbiol.*, **50**, 845-855.
- Mouz, N. (1999) Mécanismes de résistance aux β -lactamines: Etudes des relations structure-fonction de la Penicillin-Binding Protein 2x de *Streptococcus pneumoniae*. Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Mouz, N., Di Guilmi, A.M., Gordon, E., Hakenbeck, R., Dideberg, O. and Vernet, T. (1999) Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19175-19180.
- Mouz, N., Gordon, E., Di Guilmi, A., Petit, I., Pétillot, Y., Dupont, Y., Hakenbeck, R., Vernet, T. and Dideberg, O. (1998) Identification of a structural determinant for resistance to beta-lactam antibiotics in gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13403-13406.
- Munoz, R., Dowson, C.G., Daniels, M., Coffey, T.J., Martin, C., Hakenbeck, R. and Spratt, B.G. (1992) Genetics of resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **6**, 2461-2465.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, **419**, 587-593.
- Murray, B.E. (1990) The life and times of the enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**, 46-65.

N

- Nakagawa, J., Tamaki, S., Tomioka, S. and Matsushashi, M. (1984) Functional biosynthesis of cell wall peptidoglycan by polymorphic bifunctional polypeptides. Penicillin-binding protein 1Bs of *Escherichia coli* with activities of transglycosylase and transpeptidase. *J Biol Chem*, **259**, 13937-13946.
- Nanninga, N. (1998) Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 110-125.
- Navaza, J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 1367-1372.
- Nicholas, R.A., Krings, S., Tomberg, J., Nicola, G. and Davis, C. (2003) Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*: Implications for deacylation of the Acyl-enzyme complex. *J Biol Chem*, **10**, 10.

- Nicholas, R.A., Lamson, D.R. and Schultz, D.E. (1993) Penicillin-binding protein 1B from *Escherichia coli* contains a membrane association site in addition to its transmembrane anchor. *J.Biol.Chem.*, **268**, 5632-5641.
- Nicola, G., Peddi, S., Stefanova, M., Nicholas, R.A., Gutheil, W.G. and Davies, C. (2005) Crystal structure of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5 bound to a tripeptide boronic acid inhibitor: a role for Ser-110 in deacylation. *Biochemistry*, **44**, 8207-8217.
- Nieto, M., Perkins, H.R., Frère, J.M. and Ghuysen, J.M. (1973) Fluorescence and circular dichroism studies on the *Streptomyces* R61 DD-carboxypeptidase-transpeptidase. Penicillin binding by the enzyme. *Biochem J*, **135**, 493-505.
- Noirclerc-Savoye, M., Le Gouellec, A., Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T. and Zapun, A. (2005) In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, **55**, 413-424.
- Nozaki, Y., Katayama, N., Harada, S., Ono, H. and Okazaki, H. (1989) Lactivicin, a naturally occurring non- β -lactam antibiotic having β -lactam-like action: Biological activities and mode of action. *J. Antibiotics*, **42**, 84-93.
- Nozaki, Y., Katayama, N., Ono, H., Tsubotani, S., Harada, S., Okazaki, H. and Nakao, Y. (1987) Binding of a non- β -lactam antibiotic to penicillin-binding proteins. *Nature*, **325**, 179-180.

O

- Ogura, T., Bouloc, P., Niki, H., D'Ari, R., Hiraga, S. and Jaffe, A. (1989) Penicillin-binding protein 2 is essential in wild-type *Escherichia coli* but not in *lov* or *cya* mutants. *J Bacteriol*, **171**, 3025-3030.
- Oliva, M., Dideberg, O. and Field, M.J. (2003) Understanding the acylation mechanisms of active-site serine penicillin-recognizing proteins: a molecular dynamics simulation study. *Proteins*, **53**, 88-100.
- Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B. and Michel, H. (1995) Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome c oxidase. *Nat Struct Biol*, **2**, 842-846.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.

P

- Paetzel, M., Danel, F., de Castro, L., Mosimann, S.C., Page, M.G. and Strynadka, N.C. (2000) Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol*, **7**, 918-925.
- Paik, J., Kern, I., Lurz, R. and Hakenbeck, R. (1999) Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.*, **181**, 3852-3856.
- Parès, S., Mouz, N., Pétillet, Y., Hakenbeck, R. and Dideberg, O. (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 284-289.
- Peleg, A.Y., Franklin, C., Bell, J.M. and Spelman, D.W. (2005) Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin. Infect. Dis.*, **41**, 1549-1556.

- Pernot, L., Chesnel, L., Le Gouellec, A., Croize, J., Vernet, T., Dideberg, O. and Dessen, A. (2004) A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to β -lactam antibiotics. *J. Biol. Chem.*, **279**, 16463-16470.
- Petoukhov, M.V., Eady, N.A., Brown, K.A. and Svergun, D.I. (2002) Addition of missing loops and domains to protein models by x-ray solution scattering. *Biophys J*, **83**, 3113-3125.
- Petoukhov, M.V. and Svergun, D.I. (2005) Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J*, **89**, 1237-1250.
- Pichoff, S. and Lutkenhaus, J. (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **21**, 685-693.
- Pinho, M.G., de Lencastre, H. and Tomasz, A. (2001) An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10886-10891.
- Pinho, M.G. and Errington, J. (2003) Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol. Microbiol.*, **50**, 871-881.
- Pinho, M.G. and Errington, J. (2005) Recruitment of penicillin-binding protein PBP2 to the division site of *Staphylococcus aureus* is dependent on its transpeptidation substrates. *Mol. Microbiol.*, **55**, 799-807.
- Popham, D.L. and Setlow, P. (1996) Phenotypes of *Bacillus subtilis* mutants lacking multiple class A high-molecular-weight penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.*, **178**, 2079-2085.
- Popham, D.L. and Young, K.D. (2003) Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 594-599.

R

- Rajashankar, K.R., Ray, S.S., Bonanno, J.B., Pinho, M., Tomasz, A. and Burley, S.K. (2004) Crystal structure of penicillin-binding protein 4 (PBP4) from *Staphylococcus aureus*. PDB code 1TVF. *to be published*.
- Ritzeler, O., Hennig, L. and van Heijenoort, J. (1997) Synthesis of a trisaccharide analogue of moenomycin A₁₂. Implication of new moenomycin structure-activity relationships. *Tetrahedron*, **5**, 1675-1694.
- Robbins, J.B., Austrian, R., Lee, C.J., Rastogi, S.C., Schiffman, G., Henrichsen, J., Makela, P.H., Broome, C.V., Facklam, R.R., Tiesjema, R.H. and et al. (1983) Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J Infect Dis*, **148**, 1136-1159.
- Romeis, T. and Holtje, J.V. (1994) Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21603-21607.
- Ropp, P.A. and Nicholas, R.A. (1997) Cloning and characterization of the ponA gene encoding penicillin-binding protein 1 from *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.*, **179**, 2783-2787.
- Rossmann, M.G. and Blow, D.M. (1962) The detection of sub-unit within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.*, **15**, 24-31.
- Rybkin, T., Mainardi, J.L., Sougakoff, W., Collatz, E. and Gutmann, L. (1998) Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J. Infect. Dis.*, **178**, 159-163.

S

- Sahm, D.F., Kissinger, J., Gilmore, M.S., Murray, P.R., Mulder, R., Solliday, J. and Clarke, B. (1989) In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **33**, 1588-1591.
- Sankilampi, U., Honkanen, P.O., Bloigu, A. and Leinonen, M. (1997) Persistence of antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in the elderly. *J Infect Dis*, **176**, 1100-1104.
- Sauvage, E., Herman, R., Petrella, S., Duez, C., Bouillenne, F., Frere, J.M. and Charlier, P. (2005) Crystal structure of the *Actinomadura R39* DD-peptidase reveals new domains in penicillin-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **280**.
- Sauvage, E., Kerff, F., Fonze, E., Herman, R., Schoot, B., Marquette, J.P., Taburet, Y., Prevost, D., Dumas, J., Leonard, G., Stefanic, P., Coyette, J. and Charlier, P. (2002) The 2.4 Å crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5fm from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin. *Cell Mol. Life Sci.*, **59**, 1223-1232.
- Scheffers, D.J. and Pinho, M.G. (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 585-607.
- Schiffer, G. and Holtje, J.V. (1999) Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.*, **274**, 32031-32039.
- Schmidt, L.S., Botta, G. and Park, J.T. (1981) Effects of furazlocillin, a beta-lactam antibiotic which binds selectively to penicillin-binding protein 3, on *Escherichia coli* mutants deficient in other penicillin-binding proteins. *J Bacteriol*, **145**, 632-637.
- Schwartz, B., Markwalder, J.A., Seitz, S.P., Wang, Y. and Stein, R.L. (2002) A kinetic characterization of the glycosyltransferase activity of *Escherichia coli* PBP1b and development of a continuous fluorescence assay. *Biochemistry*, **41**, 12552-12561.
- Schwartz, B., Markwalder, J.A. and Wang, Y. (2001) Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by Penicillin Binding Protein (PBP) 1b of *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11638-11643.
- Severin, A., Figueiredo, A.M. and Tomasz, A. (1996) Separation of abnormal cell wall composition from penicillin resistance through genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J.Bacteriol.*, **178**, 1788-1792.
- Sharma, U.K., Dwarakanath, P., Banerjee, N., Town, C. and Balganes, T.S. (1995) Expression and characterization of the *ponA* (ORF I) gene of *Haemophilus influenzae*: functional complementation in a heterologous system. *J.Bacteriol.*, **177**, 6745-6750.
- Sharma, V.K., Hackbarth, C.J., Dickinson, T.M. and Archer, G.L. (1998) Interaction of native and mutant *MecI* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J Bacteriol*, **180**, 2160-2166.
- Sibold, C., Henrichsen, J., König, A., Martin, C., Chalkley, L. and Hakenbeck, R. (1994) Mosaic *pbpX* genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from *pbpX* genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol*, **12**, 1013-1023.
- Silvaggi, N.R., Anderson, J.W., Brinsmade, S.R., Pratt, R.F. and Kelly, J.A. (2003) The crystal structure of phosphonate-inhibited D-Ala-D-Ala peptidase reveals an analogue of a tetrahedral transition state. *Biochemistry*, **42**, 1199-1208.

- Silvaggi, N.R., Kaur, K., Adediran, S.A., Pratt, R.F. and Kelly, J.A. (2004) Toward Better Antibiotics: Crystallographic Studies of a Novel Class of DD-Peptidase/beta-Lactamase Inhibitors. *Biochemistry*, **43**, 7046-7053.
- Smith, A.M. and Klugman, K.P. (1998) Alterations in PBP1A essential for high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 1329-1333.
- Smith, A.M. and Klugman, K.P. (2003) Site-specific mutagenesis analysis of PBP1a from a penicillin-cephalosporin-resistant pneumococcal isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 387-389.
- Smith, J.M., Dowson, C.G. and Spratt, B.G. (1991) Localized sex in bacteria. *Nature*, **349**, 29-31.
- Spratt, B.G. (1975) Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 2999-3003.
- Stefanova, M.E., Davies, C., Nicholas, R.A. and Gutheil, W.G. (2002) pH, inhibitor, and substrate specificity studies on *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5. *Biochim. Biophys. Acta*, **1597**, 292-300.
- Suzuki, H., Kato, J., Sakagami, Y., Mori, M., Suzuki, A. and Hirota, Y. (1987) Conversion of the alpha component of penicillin-binding protein 1b to the beta component in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **169**, 891-893.
- Suzuki, H., van Heijenoort, Y., Tamura, T., Mizoguchi, J., Hirota, Y. and van Heijenoort, J. (1980) In vitro peptidoglycan polymerization catalysed by penicillin binding protein 1b of *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett*, **110**, 245-249.
- Svergun, D.I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*, **25**, 495-503.
- Svergun, D.I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J*, **76**, 2879-2886.
- Svergun, D.I., Barberato, C. and Koch, M.H.J. (1995) CRY SOL-a program to evaluate X-ray solution scattering of Biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography*, **28**, 768-773.

T

- Tamura, T., Suzuki, H., Nishimura, Y., Mizoguchi, J. and Hirota, Y. (1980) On the process of cellular division in *Escherichia coli*: isolation and characterization of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4499-4503.
- Terrak, M., Ghosh, T.K., van Heijenoort, J., Van Beeumen, J., Lampilas, M., Aszodi, J., Ayala, J.A., Ghuysen, J.M. and Nguyen-Disteche, M. (1999) The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **34**, 350-364.
- Terrak, M. and Nguyen-Disteche, M. (2006) Kinetic characterization of the monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **188**, 2528-2532.
- Terwilliger, T.C. (1999) Reciprocal-space solvent flattening. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**, 1863-1871.
- Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D.*, **55**, 849-861.
- Thomson, C.J., Power, E., Ruebsamen-Waigmann, H. and Labischinski, H. (2004) Antibacterial research and development in the 21(st) Century--an industry perspective of the challenges. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 445-450.

- Thunnissen, A.M., Isaacs, N.W. and Dijkstra, B.W. (1995) The catalytic domain of a bacterial lytic transglycosylase defines a novel class of lysozymes. *Proteins*, **22**, 245-258.
- Tipper, D.J. and Strominger, J.L. (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1133-1141.
- Tipper, D.J. and Strominger, J.L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XII. Inhibition of cross-linking by penicillins and cephalosporins: studies in *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Biol Chem*, **243**, 3169-3179.
- Tomasz, A. (1999) *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. Mary Ann Liebert, Inc, New York.

V

- van Heijenoort, J. (2001a) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, **11**, 25R-36R.
- van Heijenoort, J. (2001b) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 503-519.
- van Heijenoort, Y., Gomez, M., Derrien, M., Ayala, J. and van Heijenoort, J. (1992) Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of *Escherichia coli*: possible roles of PBP 1b and PBP 3. *J Bacteriol*, **174**, 3549-3557.
- van Heijenoort, Y., Leduc, M., Singer, H. and van Heijenoort, J. (1987) Effects of moenomycin on *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, **133**, 667-674.
- VanNieuwenhze, M.S., Mauldin, S.C., Zia-Ebrahimi, M., Winger, B.E., Hornback, W.J., Saha, S.L., Aikins, J.A. and Blaszcak, L.C. (2002) The first total synthesis of lipid II: the final monomeric intermediate in bacterial cell wall biosynthesis. *J Am Chem Soc*, **124**, 3656-3660.
- Vicente, M. and Errington, J. (1996) Structure, function and controls in microbial division. *Mol Microbiol*, **20**, 1-7.
- Volkov, V. and Svergun, D.I. (2003) Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, **36**, 860-864.
- Vollmer, W. and Holtje, J.V. (2004) The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J Bacteriol*, **186**, 5978-5987.
- Vollmer, W., von Rechenberg, M. and Holtje, J.V. (1999) Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6726-6734.

W

- Walsh, C.T. (1993) Vancomycin resistance: decoding the molecular logic. *Science*, **261**, 308-309.
- Walsh, C.T., Fisher, S.L., Park, I.S., Prahalad, M. and Wu, Z. (1996) Bacterial resistance to vancomycin: five genes and one missing hydrogen bond tell the story. *Chem Biol*, **3**, 21-28.

- Wang, C.C., Schultz, D.E. and Nicholas, R.A. (1996) Localization of a putative second membrane association site in penicillin-binding protein 1B of *Escherichia coli*. *Biochem.J.*, **316**, 149-156.
- Wang, L., Khattar, M.K., Donachie, W.D. and Lutkenhaus, J. (1998) FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, **180**, 2810-2816.
- Wang, Q.M., Peery, R.B., Johnson, R.B., Alborn, W.E., Yeh, W.K. and Skatrud, P.L. (2001) Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **183**, 4779-4785.
- Ward, J.B. and Perkins, H.R. (1973) The direction of glycan synthesis in a bacterial peptidoglycan. *Biochem J*, **135**, 721-728.
- Weissenhorn, W., Calder, L.J., Dessen, A., Laue, T., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1997) Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6065-6069.
- Weston, A. and Perkins, H.R. (1977) Biosynthesis of wall-linked teichuronic acid by a wall-plus-membrane preparation from *Micrococcus luteus*. Effect of antibiotics. *FEBS Lett*, **76**, 195-198.
- Wilke, M.S., Hills, T.L., Zhang, H.Z., Chambers, H.F. and Strynadka, N.C. (2004) Crystal structures of the Apo and penicillin-acylated forms of the BlaR1 beta-lactam sensor of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, **279**, 47278-47287.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L. and Strynadka, N.C. (2005) Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*, **8**, 525-533.
- Wissel, M.C., Wendt, J.L., Mitchell, C.J. and Weiss, D.S. (2005) The transmembrane helix of the *Escherichia coli* division protein FtsI localizes to the septal ring. *J Bacteriol*, **187**, 320-328.
- Wu, S.W., de Lencastre, H. and Tomasz, A. (2001) Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **183**, 2417-2424.

Y

- Yao, X., Jericho, M., Pink, D. and Beveridge, T. (1999) Thickness and elasticity of gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J Bacteriol*, **181**, 6865-6875.
- Ye, X.Y., Lo, M.C., Brunner, L., Walker, D., Kahne, D. and Walker, S. (2001) Better substrates for bacterial transglycosylases. *J Am Chem Soc*, **123**, 3155-3156.
- Yeats, C., Finn, R.D. and Bateman, A. (2002) The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 438.

Z

- Zawadzka-Skomial, J., Markiewicz, Z., Nguyen-Disteche, M., Devreese, B., Frère, J.M. and Terrak, M. (2006) Characterization of the bifunctional glycosyltransferase/acyltransferase penicillin-binding protein 4 of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, **188**, 1875-1881.
- Zervosen, A., Lu, W.P., Chen, Z., White, R.E., Demuth, T.P., Jr. and Frère, J.-M. (2004) Interactions between penicillin-binding proteins (PBPs) and two novel classes of PBP inhibitors, arylalkylidene rhodanines and arylalkylidene iminothiazolidin-4-ones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 961-969.

- Zhang, H.Z., Hackbarth, C.J., Chansky, K.M. and Chambers, H.F. (2001) A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science*, **291**, 1962-1965.
- Zorzi, W., Zhou, X.Y., Dardenne, O., Lamotte, J., Raze, D., Pierre, J., Gutmann, L. and Coyette, J. (1996) Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J.Bacteriol.*, **178**, 4948-4957.

Annexes

Annexe A

Milieux de cultures

1. Milieu minimum M9 (1L)

1.1. Milieu minimum

750 mL H₂O stérile < 50°C
200 mL tampon sels 5x
2 mL MgSO₄ 1 M
20 mL glucose 20%
0.1 mL CaCl₂ 1 M
200 mg thiamine (Vitamine D)
qsp 1L eau

1.2. Tampon sels 5x (1L)

64 g Na₂HPO₄, 7H₂O
15 g KH₂PO₄
2.5 g NaCl
5 g NH₄Cl
qsp 1L eau

2. Milieu riche d'auto-induction (1L)

1 mL MgSO₄ 1 M stérile
20 mL solution 5052 50x stérile
50 mL solution NPS 20x stérile
qsp 1L milieu ZY stérile

2.1. solution 5052 50x (100 mL)

25 g glycérol
73 mL eau
2.5 g glucose
10 g α-lactose

2.2. solution NPS 20x (100 mL)

90 mL eau
6.6 g (NH₄)₂SO₄
13.6 g KH₂PO₄
14.2 g Na₂HPO₄
ajuster le Ph à 6.75

2.3. milieu ZY (1L)

10 g tryptone
5 g extrait de levure
925 mL eau

Annexe B

Souches bactériennes et leurs génomes

Souche BL21(DE3)

E. coli B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)

Souche BL21(DE3)pLysS

E. coli B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Camr]

Souche BL21-CodonPlus(DE3)-RIL

E. coli B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm* Tetr gal λ (DE3) *endA* Hte [*argU ileY leuW* Camr]

Souche BL21-CodonPlus(DE3)-RP

E. coli B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm* Tetr gal λ (DE3) *endA* Hte [*argU proL* Camr]

Souche JM109

e14⁻(McrA⁻) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺) *supE44 relA1* Δ(*lac-proAB*) [F' *traD36 proAB lacIZΔM15*].

Souche Origami

F⁻ *ompT hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) gal *dcm lacY1 aphC gor522::Tn10 trxB* (KanR, TetR)

Publication 1

Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins

Pauline Macheboeuf[†], Anne Marie Di Guilmi[‡], Viviana Job[†], Thierry Vernet[‡], Otto Dideberg[†], and Andréa Dessen^{†§}

Laboratoires [†]de Cristallographie Macromoléculaire and [‡]d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Centre National de la Recherche Scientifique/Commissariat à l'Énergie Atomique/Université Joseph Fourier, 41 Rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble, France

Edited by Christopher T. Walsh, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved December 1, 2004 (received for review September 29, 2004)

Bacterial cell division is a complex, multimolecular process that requires biosynthesis of new peptidoglycan by penicillin-binding proteins (PBPs) during cell wall elongation and septum formation steps. *Streptococcus pneumoniae* has three bifunctional (class A) PBPs that catalyze both polymerization of glycan chains (glycosyltransfer) and cross-linking of pentapeptidic bridges (transpeptidation) during the peptidoglycan biosynthetic process. In addition to playing important roles in cell division, PBPs are also the targets for β -lactam antibiotics and thus play key roles in drug-resistance mechanisms. The crystal structure of a soluble form of pneumococcal PBP1b (PBP1b*) has been solved to 1.9 Å, thus providing previously undescribed structural information regarding a class A PBP from any organism. PBP1b* is a three-domain molecule harboring a short peptide from the glycosyltransferase domain bound to an interdomain linker region, the transpeptidase domain, and a C-terminal region. The structure of PBP1b* complexed with β -lactam antibiotics reveals that ligand recognition requires a conformational modification involving conserved elements within the cleft. The open and closed structures of PBP1b* suggest how class A PBPs may become activated as novel peptidoglycan synthesis becomes necessary during the cell division process. In addition, this structure provides an initial framework for the understanding of the role of class A PBPs in the development of antibiotic resistance.

antibiotic | cell wall | transpeptidase | glycosyltransferase

S*treptococcus pneumoniae* is a major human pathogen, being the causative agent of pneumonia and meningitis, which victimize >1 million individuals yearly, especially in developing countries. Treatment of such infections has, for >60 years, depended on β -lactam antibiotics, which perturb the cell wall biosynthetic machinery by targeting penicillin-binding proteins (PBPs). PBPs catalyze the last steps in the synthesis of the peptidoglycan, a 3D cross-linked mesh composed of repeating disaccharide units linked to peptidic bridges (1); stability of the peptidoglycan not only is necessary for bacterial shape and morphology, but its synthesis is an absolute requirement for normal cell division and growth processes. Thus, targeting of the peptidoglycan biosynthetic machinery by β -lactams often leads to cell lysis and death.

The dissection of the functions of PBPs within growth and division processes has proven to be challenging in microorganisms such as *Escherichia coli*, which has 12 PBPs, and *Bacillus subtilis*, whose 7 PBPs also participate in sporulation. *S. pneumoniae* has six PBPs, three of which catalyze both glycosyltransfer and transpeptidation of the peptidoglycan (PBPs 1a, 1b, and 2a; class A), two of which catalyze uniquely the transpeptidation reaction (PBPs 2x and 2b; class B), and PBP3, which acts as a *D,D*-carboxypeptidase (2).

In the bacterial cell cycle, peptidoglycan synthesis occurs during two major stages: wall elongation and cell division, or septation. Septation starts once FtsZ, the bacterial homolog of tubulin, polymerizes in the form of a contractile ring at the future division site, and \approx 12 proteins are recruited subsequently in a defined order at the site of the constricting ring (3). Each of the two processes has been shown to specifically require one class A and one class B PBP: The elongation process involves PBP2a and PBP2b in *S. pneumoniae*, whereas division involves PBP1a and PBP2x. In *S. pneu-*

moniae, PBP1b, the third class A molecule, was shown to participate both in elongation and septation but never in the same cell (4); in addition, inactivation of PBP1b together with either of the two other class A enzymes yielded viable strains with defects in septum positioning (5) or that displayed slower growth than the wild-type (WT) strain (6). These observations suggest that there is a precise, but not yet fully understood, role for class A PBPs in the cell-division process.

Class A PBPs are membrane-associated enzymes that harbor both glycosyltransferase (GT) and transpeptidase (TP) activities on the same polypeptide in the form of distinct domains identifiable by classic motifs. Thus, these enzymes are optimally constructed to catalyze the concerted polymerization of *N*-acetylmuramic acid- β -1,4-GlcNAc moieties and cross-linking of stem peptides by employing the periplasmically located lipid II as substrate (2). The GT domain is of particular interest because it may harbor a yet-uncharacterized fold and thus could be a novel potential antibacterial development target (7). In addition, certain class A PBPs are involved in the development of antibiotic resistance (8–10). Despite their importance in cell division and antibiotic-resistance processes, as well as their potential application in the drug-development industry, structural information regarding class A PBPs has to date remained elusive. In this work, we report the crystal structure of a class A PBP, that of a soluble form of PBP1b (PBP1b*) from *S. pneumoniae*. PBP1b* harbors a short peptide from the N terminus of the GT domain, the entire interdomain junction region, and the TP domain, followed by a small C-terminal region. Interestingly, PBP1b* displays a closed, inaccessible active cleft in the absence of ligand, whereas a large conformational modification, involving loop movement and repositioning of key catalytic elements, is observed in the active site in the presence of antibiotics. These observations suggest that PBPs may exist in inactive conformations during phases of the cell-division cycle in which they do not participate, becoming activated only as needed. In addition, the structure also provides insight into drug-resistance mechanisms generated by mutant class A PBPs.

Materials and Methods

Sample Preparation. PBP1b* was purified as described in ref. 11. This procedure generated a protein product with three proteolytic sites (deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org [PDB ID codes 2bg1 (PBP1b*), 2bg3 (PBP1b*-nitrocefin), and 2bg4 (PBP1b*-cefotaxime)].

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: PBP, penicillin binding protein; GT, glycosyltransferase; TP, transpeptidase; S2d, *N*-benzoyl-D-alanylmercaptoacetic acid.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org [PDB ID codes 2bg1 (PBP1b*), 2bg3 (PBP1b*-nitrocefin), and 2bg4 (PBP1b*-cefotaxime)].

[§]To whom correspondence should be addressed. E-mail: dessen@ibs.fr.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

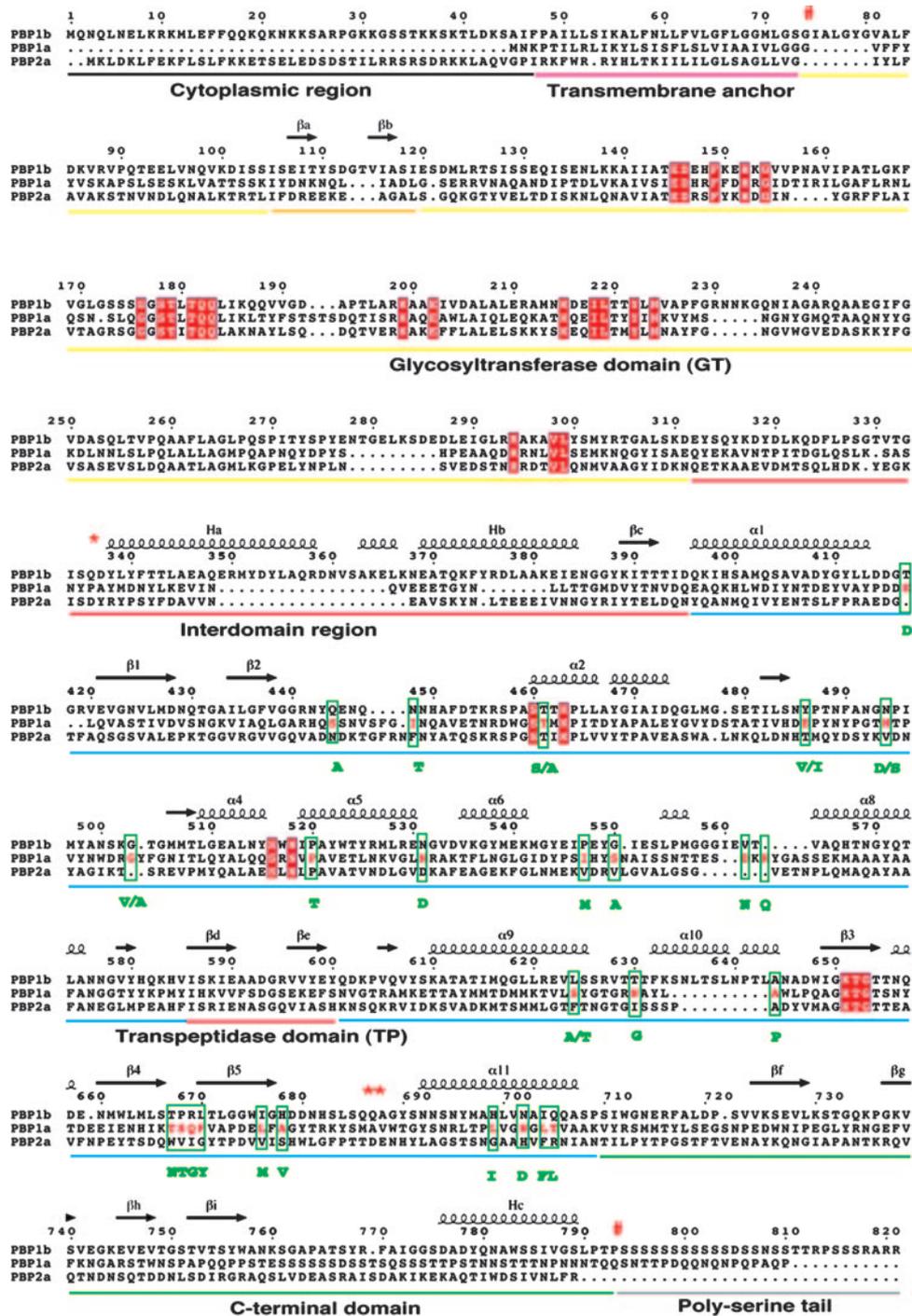


Fig. 1. Sequence alignment of class A PBPs from *S. pneumoniae*, strain R6. The secondary structure elements of PBP1b* are shown over the sequences. Conserved motifs are shown inside red boxes. The three mutations introduced into PBP1b are identified with red "X" marks. The beginning and ends of the full-length clone are shown with #. Residues mutated in a PBP1a from streptococcal clinical resistant strain 8303 (described in ref. 9) are surrounded by green boxes; mutations are shown underneath.

Crystallization and Data Collection. Crystals of PBP1b* were obtained by the hanging-drop vapor-diffusion method by mixing 1 μ l of the protein sample (6.4 mg/ml in 20 mM Hepes, pH 7.0/100 mM NaCl/1 mM EDTA) with 1 μ l of 50 mM Hepes, pH 7.0/0.8 M (NH₄)₂SO₄/2.8 M NaCl at 15°C. Before data collection, each crystal was briefly immersed in a cryoprotectant solution containing 20% ethylene glycol and flash-cooled in liquid nitrogen. A native data set was collected to 1.9 Å at the European Synchrotron Radiation Facility BM30 beamline (Grenoble); crystals belonged to space group C222₁.

Selenomethionine-derivatized PBP1b* crystals were grown in conditions similar to those used for the native protein. No antibiotic-complexed crystals were obtained by either (i) incubating native crystals in the presence of high amounts of antibiotics, or (ii) attempting to cocrystallize PBP1b* with different antibiotics. Nitrocef- and cefotaxime-soaked crystals were obtained only after washing native crystals that had been complexed previously to *N*-benzoyl-D-alanylmercaptoacetic acid (S2d) in ligand-free mother liquor and subsequently incubating them with 3 μ l of 633 μ M nitrocef- or 320 μ M cefotaxime for 3 h. S2d-complexed crystals

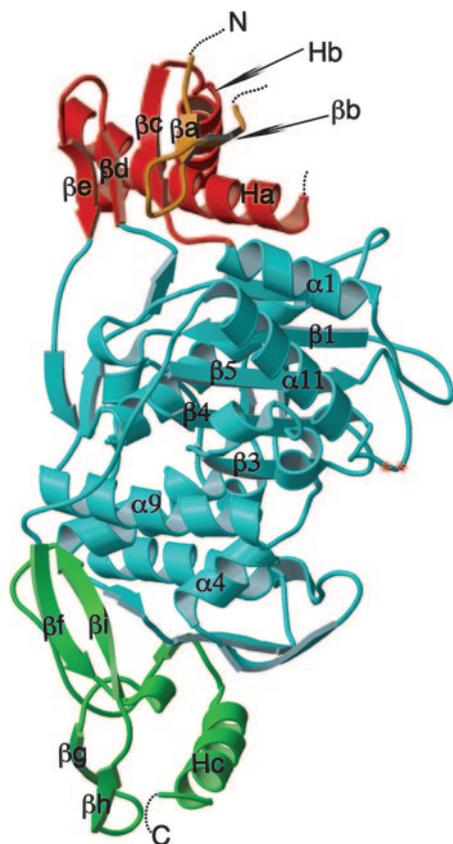


Fig. 2. Tertiary fold of PBP1b*. The TP domain (center, blue) is flanked by the GT/TP interdomain region (red) and a peptide from the GT domain (top, orange) as well as the C-terminal domain (bottom, green). From this point of view, the active site is located between $\beta 3$ and $\alpha 4$. The residues that are not visible in the electron density map are represented as dotted lines.

were obtained by mixing 16 μ l of PBP1b* (12.7 mg/ml in 20 mM Hepes, pH 7.0/100 mM NaCl/1 mM EDTA) with 8 μ l of 15 mM S2d and allowing a 5-min reaction time. Subsequently, 1 μ l of the protein/S2d mixture was mixed with 1 μ l of 50 mM Hepes (pH 7.0), 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and 2.8 M NaCl at 15°C, and crystals were obtained by the hanging-drop vapor-diffusion method using the latter solution as mother liquor. Cryoprotection was performed in 12% ethylene glycol. Data were collected at European Synchrotron Radiation Facility beamlines BM30 (S2d, nitrocefim) and ID14-EH2 (cefotaxime). All data were processed with the programs DENZO and SCALEPACK (12).

Determination of Native and Complex Structures. The structure of PBP1b* was solved by multiple anomalous dispersion by using data collected on the Se edge. We located 16 Se sites in the asymmetric unit and used them for phase determination at 2.4 Å with the program SOLVE (13); phases were subsequently improved, and solvent flattening was performed with the program RESOLVE (14). A model constructed into this electron density map was used in a molecular replacement experiment with the 1.9-Å data set (AMORE; ref. 15). Energy minimization, temperature factor refinement, and simulated annealing steps were performed with the program CNS (16), and manual model improvement was achieved with the program QUANTA (Molecular Simulations, Waltham, MA). Structures of S2d- and antibiotic-complexed crystals were solved by employing the 1.9-Å-data-derived model that lacked the active site gorge, including $\beta 3$, $\beta 4$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, and the N-terminal region of $\alpha 2$ (15). The S2d complex structure showed poor ligand density and thus is not further discussed. However, these crystals were useful for

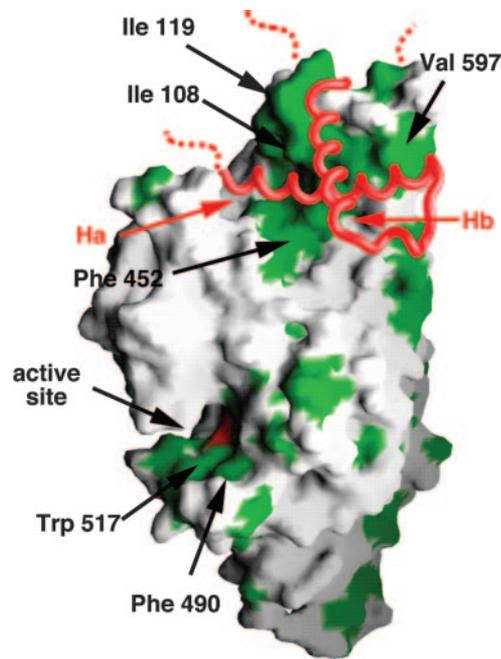


Fig. 3. Surface representation of PBP1b*, with the GT/TP interdomain linker region shown as a red C $^{\alpha}$. Hydrophobic residues are shown in green.

the preparation of complexes with antibiotics, because direct soaking or cocrystallization attempts of PBP1b* with β -lactams were unsuccessful. The native, nitrocefim, and cefotaxime structures displayed 99.4%, 99.3%, and 98% of the nonglycine residues, respectively, in the most favored and allowed regions of the Ramachandran plot (PROCHECK; ref. 17). Molecule B in the PBP1b*-cefotaxime structure lacks 20 residues at the N termini of Ha and Hb. Statistics for data collection and structure refinement are included in *Supporting Text* and Tables 2 and 3, which are published as supporting information on the PNAS web site.

Results

Overall Structure. PBP1b from *S. pneumoniae* contains a short cytoplasmic region and an N-terminal membrane anchor, followed by a 25-kDa GT joined to a 50-kDa TP domain through a long linker region (Fig. 1). In the absence of diffracting crystals of the full-length, soluble form of PBP1b, attempts were made to produce a stable form through trypsinolysis of the molecule. This procedure generated a soluble fragment with three internal cleavage sites (11), which yielded only microcrystalline precipitate. Mutagenesis of these sites yielded a stable form of PBP1b (PBP1b*) that produced high-quality crystals that were used for structure determination by multiple anomalous dispersion using selenomethionyl-substituted protein. The crystallized PBP1b* is composed of two associated polypeptides: Gly-306–Pro-791, which encompasses the GT/TP junction region (residues 306–396), the TP domain (residues 397–710), and a small C-terminal region (residues 711–791); and Asp-101–Arg-125, a peptide derived from the N terminus of the GT domain that remained bound to the rest of the molecule after tryptic cleavage and purification.

PBP1b* is a three-domain molecule: the N-terminal domain contains the GT peptide and the GT/TP interdomain region (red in Figs. 1 and 2); the central region harbors the TP domain (blue in Figs. 1 and 2); and at the C terminus there is small, β -strand-rich terminal region (green in Figs. 1 and 2) with no structural similarity in searched databases. At the N terminus, the GT peptide (of which only residues 105–119 are traceable) folds into two short β strands (βa and βb ; orange in Fig. 2), which are part of a five-stranded β sheet, with other strands being contributed by the TP domain. The

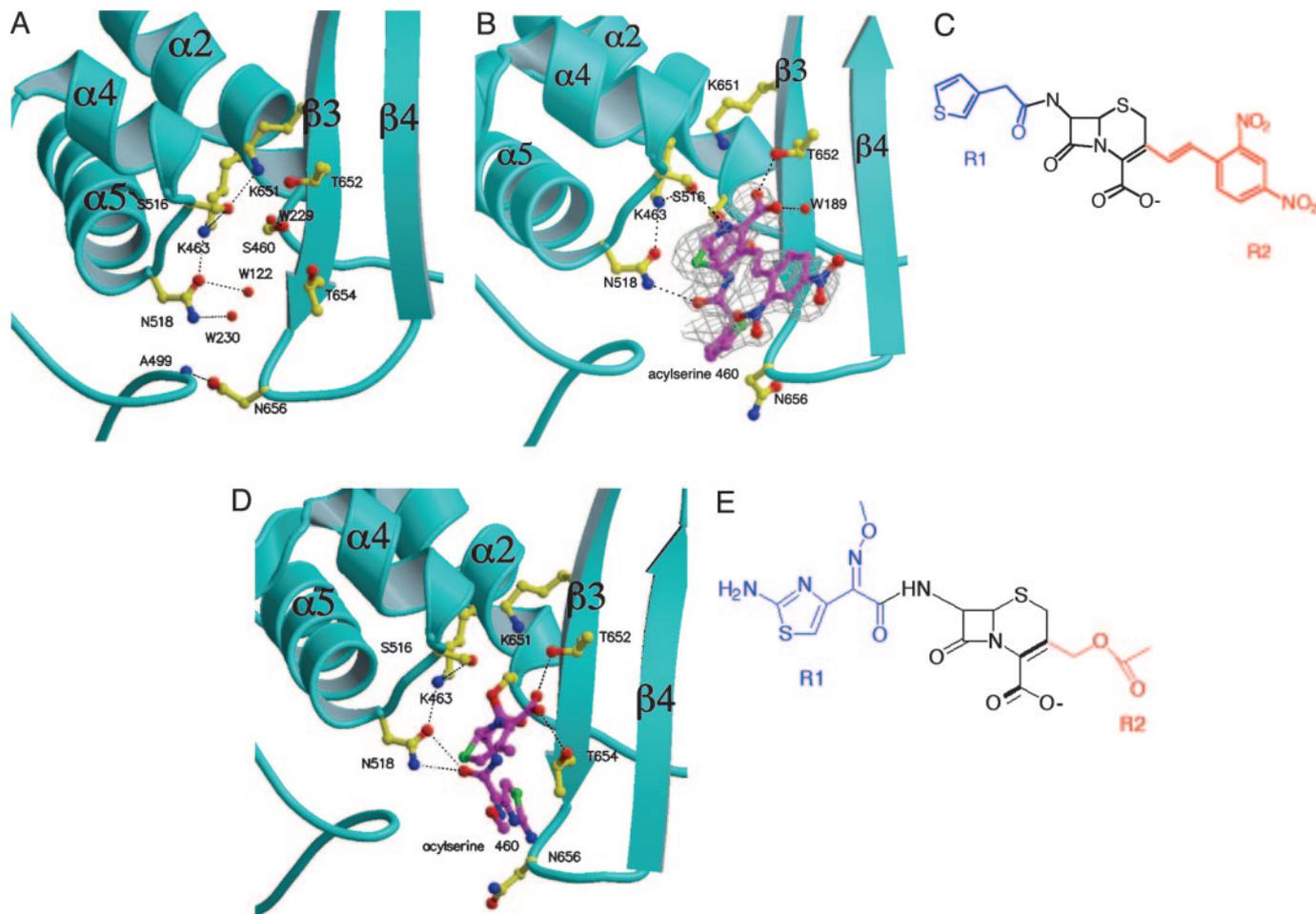


Fig. 4. The PBP1b* active site. (A) In the native structure, $\beta 3$ moves away from $\beta 4$, and their interconnecting loop closes the active site gorge. (B) PBP1b*-acylserine 460 complex. An $F_o - F_c$ omit map contoured at 2.3σ is shown. (C) The chemical structure of nitrocefin. (D) PBP1b*-acyl-cefotaxime complex. (E) The chemical structure of cefotaxime before acylation.

GT/TP interdomain region is composed of two perpendicular helices (Ha/Hb) separated by a turn. Interestingly, Ha/Hb is stabilized by a hydrophobic funnel (green in Fig. 3) generated by residues Leu-426, Phe-452, Ile-586, Val-597, and Tyr-598, among others, which are positioned laterally on the TP domain, as well as Ile-108, Val-115, Ile-116, and Ile-119, which are contributed by the GT peptide on the five-stranded β -sheet. In Fig. 3, dotted lines represent sequences within the GT domain that are missing from the structure. Notably, Ha, which immediately follows the C terminus of the missing GT domain, is packed snugly within the hydrophobic funnel, whereas Hb is more solvent-exposed. It is of note that binding of the interdomain region on the funnel does not completely cover the hydrophobic patch, and a variety of hydrophobic residues, contributed by the five-stranded β -sheet and the N terminus of Ha, remain solvent-exposed. This organization may provide a hydrophobic recognition patch for the full-length GT domain (see below).

The central region of the molecule harbors the TP domain, which carries the classical signature of the penicilloyl serine transferase superfamily. This domain can be described by a central, antiparallel β -sheet composed of five strands ($\beta 3/\beta 4/\beta 5/\beta 1/\beta 2$) sandwiched between three α helices [$\alpha 1$ and $\alpha 11$ on one side and $\alpha 8$ on the opposite side of the sheet (blue in Fig. 2)]; the numbering scheme follows that used for class A β -lactamases (18). This fold is found in other β -lactam and peptidoglycan-recognizing enzymes, such as class A β -lactamases (18), the *Streptomyces* K15 transpeptidase (19), and class B PBPs (20–22), albeit with low sequence identities.

Superposition of the C^α trace of the TP domain of PBP1b* with that of PBP2x (287 C^α pairs), K15 (182 C^α pairs), and TEM-1 β -lactamase (233 C^α pairs) yielded rms deviation values of 2.9, 3.0, and 3.4 Å, respectively, revealing significant structural differences.

Active Site Flexibility Regulates Antibiotic Binding. The TP active site of PBP1b* harbors three conserved structural motifs: SXXXK (Ser-460–Thr-461–Thr-462–Lys-463), which includes the nucleophilic Ser-460 residue and is located at the N-terminal end of helix $\alpha 2$; SXN (Ser-516–Trp-517–Asn-518), which forms the turn between helices $\alpha 4$ and $\alpha 5$ on the left side of the cavity; and KTG (Lys-651–Thr-652–Gly-653), which lines strand $\beta 3$ (Fig. 4A). Surprisingly, the active site cavity of PBP1b* contains a major difference from any other of the above-mentioned enzymes in that it is unequivocally unavailable for ligand binding. The interactions between the C terminus of $\beta 3$ (Thr-654) and the N-terminal region of $\beta 4$ are disrupted by movement of the intervening loop into the active site region. The stability of this form is such that the C terminus of $\beta 3$ is “pulled” away from $\beta 4$, disrupting the local antiparallel nature of the two strands. As a consequence, the side chain of Asn-656 blocks entry into the catalytic cleft and forms a hydrogen bond with the backbone nitrogen of Ala-499, located on the facing loop. Moreover, the O^γ atom of the active site serine (Ser-460) contacts backbone atoms of $\beta 3$ and does not interact with any of the canonical catalytic residues.

To biochemically characterize the unusual active site of PBP1b*, acylation of the enzyme by β -lactam antibiotics was measured by

Table 1. Acylation constants (k_2/K) for binding of different antibiotics to PBP1b* and PBP1b

Antibiotic	PBP1b* (101–125; 306–791)	FL PBP1b* (74–791)	FL PBP1b WT (74–791)
Cephalothin	90.8 ± 3.2	85.3 ± 3.9	253.8 ± 20.0
Cefotaxime	7.8 ± 0.4	7.0 ± 0.2	44.2 ± 1.9
Penicillin G	6.5 ± 0.3	5.0 ± 0.2	19.1 ± 1.8
Nitrocefin	99.7 ± 10.0	ND	ND

Values are $\times 10^3 \text{ m}^{-1}\text{s}^{-1}$ (means ± SD). ND, not determined.

stopped-flow techniques. k_2/K acylation constants are comparable to those obtained for other PBPs (23, 24) and are shown in Table 1. Stabilities of the antibiotic–enzyme complexes were assayed by electrospray ionization-MS, which yielded approximate k_3 values of 1.5 h^{-1} and $>24 \text{ h}^{-1}$ for nitrocefin and cefotaxime, respectively. These studies clearly indicated that PBP1b* is catalytically active, and thus the catalytic TP domain gorge should be amenable to modification by the presence of a ligand.

To test this hypothesis, crystals of PBP1b* were prepared in the presence of antibiotics nitrocefin and cefotaxime. Cocrystals were obtained in two different space groups (C222₁ and P2₁2₁2₁) by employing the same crystallization solution. The nitrocefin-acyl-PBP1b* and cefotaxime-acyl-PBP1b* structures reveal that the products are covalently associated to the O γ atom of Ser-460, which then points into the active site (Fig. 4 B–E). In both structures, the backbone nitrogen atoms of Ser-460 and Thr-654 form the conserved oxyanion hole. The carboxylate group of nitrocefin (Fig. 4B) is stabilized by the O γ atom of Thr-652 as well as by a stably positioned water molecule. The O γ atom of Ser-516 forms a hydrogen bond with the leaving group nitrogen. In addition, the R1 moiety of nitrocefin is wedged between Asn-656 and -518 and makes van der Waals contacts with the loop composed of residues 496–500 (thus stabilizing the left side of the cavity).

Although cefotaxime only has an exomethylene (CH₂) group as R2 moiety after acylation, its carboxylate group on the β -lactam ring is hydrogen-bonded to the O γ atoms of both Thr-652 and -654; in addition, the carbonyl group is stabilized by Asn-518 (Fig. 4D). Thus, both antibiotics are capable of accessing the active site serine, suggesting that the closed PBP1b* active site is only a transient form of the enzyme. Importantly, in both ligand-bound structures, the conformation of β 3 is reestablished, in that it is stably positioned in antiparallel fashion to β 4 in its entirety, and the loop that connects the two strands moves away from the gorge, generating an “open,” or activated, active site cleft (Fig. 4 B and D). Active site opening thus reveals an elongated recognition cleft that could accommodate one or two arms of a peptidoglycan stem peptide (compare A and B in Fig. 5).

Figure Preparation. Figures were prepared with the programs MOLSCRIPT (30), BOBSCRIPT (31), GRASP (32), and ESPRIPT 2.2 (33).

Discussion

Class A PBPs are membrane-associated enzymes ubiquitous to all peptidoglycan-producing bacteria and are responsible for both the polymerization of glycan chains and transpeptidation of stem peptides, the last steps of peptidoglycan biosynthesis. Because novel peptidoglycan production is an essential phase of cell division and growth, class A PBPs play important roles in both processes. *S. pneumoniae* has three class A PBPs, which have proven to be challenging for both biochemical and structural studies. In this paper, we describe the crystal structure of a soluble form of a pneumococcal class A PBP (PBP1b*) that folds as three intimately interacting domains but lacks most of the GT region, except for a N-terminal, 25-residue peptide that remained associated to the body of the molecule after proteolysis and whose central region (residues 105–119) interacts with the GT/TP interdomain region

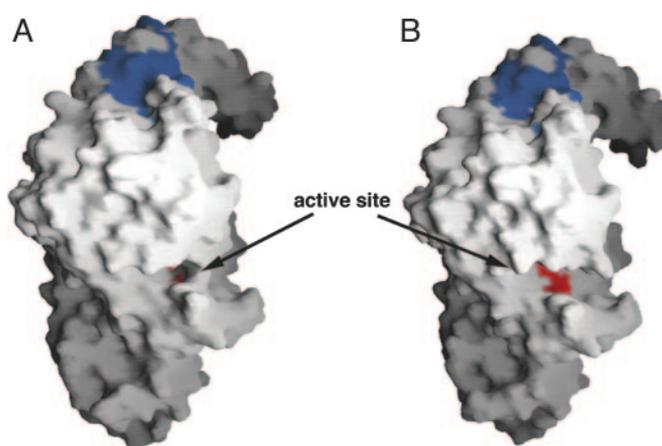


Fig. 5. Surface representation of PBP1b* in closed and open conformations. (A) In the closed conformation, the active site is blocked and unavailable for binding. (B) Opening of the catalytic gorge reveals an elongated binding cleft with the active site (shown in red) at the bottom. A surface-exposed hydrophobic patch could stabilize the GT domain and position it axially with respect to the TP active site.

through hydrophobic contacts (see Fig. 3). The proximity of the peptide to the GT/TP interdomain region, as well as the presence of a number of solvent-exposed hydrophobic residues in both areas (blue in Fig. 5), allow us to propose that the small, full-length GT domain may interact with the hydrophobic patch formed by these two regions. Thus, in the full-length PBP, the GT domain could be accommodated on the same side of the molecule as the TP active site.

The high similarity in k_2/K values measured for PBP1b* and for the full-length form of the mutated enzyme (FL PBP1b*; Table 1) suggests that the affinity of the molecule for antibiotics is not dependent on the presence of the GT domain, a behavior shared by pneumococcal PBP1a (23). Interestingly, however, the WT, full-length enzyme (FL PBP1b) displays second-order rate constants that range between 2.8- and 6.3-fold higher than for PBP1b* and FL PBP1b* and which harbor Arg → Gln mutations at positions 336, 686, and 687. All three mutant residues are located $>20 \text{ \AA}$ from the active site serine; however, Arg-686 and -687 are located on the loop between β 5 and α 11 on the TP domain (red asterisks in Fig. 2). In the WT enzyme, their surface exposure could enable their side chains to stabilize the negative charge present on incoming antibiotics, which would not be possible once they are mutated into glutamines. This factor could explain the small observed difference between kinetic constants. Notably, circular dichroism experiments performed on WT and mutant PBP1b molecules did not identify any significant structural differences, even in the presence of antibiotic (data not shown).

In Streptococci, low β -lactam-affinity PBPs are present as highly mosaic molecules; PBP1a, -2x, and -2b are primary resistance determinants, and the presence of mutations throughout their entire TP domains is essential for the development of high-level resistance (10). Although PBP1b has not been linked to the development of resistance, the structure presented here can be used as a first framework for understanding how streptococci can develop resistance through mutation of PBP1a, with which PBP1b shares 45% sequence similarity within the TP domain. Mapping of mutations of a PBP1a from a highly penicillin-resistant streptococcal strain (9) onto the PBP1b* TP domain (Fig. 1) reveals three areas of particular interest. At the N terminus of α 2, the SXXK motif (STTK) harbors the active site serine; mutation of the first threonine in the motif to alanine/serine may cause disruption of the hydrogen-bonding pattern within the cleft, as has been described for the identical mutation in PBP2x molecules from highly resistant

strains (24). In addition, the N terminus of $\alpha 5$, which immediately follows the SXN motif, displays a mutation of a highly conserved proline residue, which could affect stability of the α -helical chain. Lastly, a number of mutations are found within $\beta 4$ and $\beta 5$, which form the core of the conserved central β -sheet. High-resolution structures of PBP1a molecules from sensitive and resistant pneumococcal strains will be required to shed further light on this mechanism.

Analysis of the TP domain of PBP1b* reveals the most outstanding characteristic of the molecule: an activation phenomenon reflected in the existence of the active site gorge in closed and open conformations, the latter only possible in the presence of ligands. The two forms of PBP1b* were identified in two different space groups, which crystallized in the same solution and often in the same drop; no interactions generated by symmetry-related elements were observed in the active site regions. The opening and closing of the PBP1b* active site involve a substantial conformational modification, with substrate accessibility being blocked in the closed form. Ligand recognition requires that strands $\beta 3$ and $\beta 4$ be antiparallel in the active site area and that their interconnecting loop move away from the entrance of the cleft. This phenomenon was observed for both a large antibiotic molecule with a bulky, very hydrophilic R2 substituent (nitrocefin) as well as for one with a minor R2 group (cefotaxime). Notably, in structures of β -lactamases and transpeptidases (including drug-resistant PBPs) reported to date, the antiparallel nature between $\beta 3$ and $\beta 4$ is always maintained in the presence or absence of ligands, and there is no

dramatic blocking of the entrance of the cleft as seen here (compare the catalytic clefts in Fig. 5 A (closed) and B (open)).

PBPs have been shown to play carefully orchestrated roles in cell division (4, 25–28). Recently, it has been reported that *E. coli* PBP3 (FtsI) becomes acylated at a faster rate in dividing cells than in nondividing cells, and the authors suggested that the enzyme's TP activity may become activated during septation (29). Based on those observations and our results reported here, we propose a model where PBPs could exist in nondividing cells in inactive ("closed") states. As their participation becomes essential within the cell-division cycle, PBPs would become active, either by recognizing substrate or by interacting with other members of a potential cell division or peptidoglycan elongation macromolecular complex. It is also possible that PBPs may exist in both closed and open conformations in the cell, the former switching into the latter depending on substrate availability or localization. Either way, the two forms of PBPs could provide the cell with a distinct handle on cell wall biosynthesis regulation.

We thank Marc Jamin for help with stopped-flow experiments, David Lascoux for mass spectrometry measurements, and the European Synchrotron Radiation Facility BM30 and ID14 staff for help with data collection. P.M. is a recipient of a CFR fellowship from the Commissariat à l'Énergie Atomique. A.D. is an European Molecular Biology Organization Young Investigator. This work was supported by European Commission Grant LSHM-CT-2003-503335 (COBRA) and an ACI Jeunes Chercheurs grant from the French Ministry of Research (to A.D.).

- Höltje, J. V. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 181–203.
- Goffin, C. & Ghuysen, J. M. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1079–1093.
- Errington, J., Daniel, R. A. & Scheffers, D. J. (2003) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 52–65.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O. & Vernet, T. (2003) *Mol. Microbiol.* **50**, 845–855.
- Paik, J., Kern, I., Lurz, R. & Hakenbeck, R. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 3852–3856.
- Hoskins, J., Matsushima, P., Mullen, D. L., Tang, J., Zhao, G., Meier, T. I., Nicas, T. I. & Jaskunas, S. R. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 6552–6555.
- Walsh, C. (2003) *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 65–70.
- Smith, A. M. & Klugman, K. P. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 387–389.
- Smith, A. M. & Klugman, K. P. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1329–1333.
- Hakenbeck, R., König, A., Kern, I., van der Linden, M., Keck, W., Billot-Klein, D., Legrand, R., Schoot, B. & Gutmann, L. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1831–1840.
- Di Guilmi, A. M., Dessen, A., Dideberg, O. & Vernet, T. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 1650–1658.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999) *Acta Crystallogr. D* **55**, 849–861.
- Terwilliger, T. C. (1999) *Acta Crystallogr. D* **55**, 1863–1871.
- Navaza, J. (2001) *Acta Crystallogr. D* **57**, 1367–1372.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., et al. (1998) *Acta Crystallogr. D* **54**, 905–921.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291.
- Lobkovsky, E., Moews, P. C., Liu, H., Zhao, H., Frere, J. M. & Knox, J. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11257–11261.
- Kelly, J. A., Knox, J. R., Moews, P. C., Hite, G. J., Bartolone, J. B., Zhao, H., Joris, B., Frère, J. M. & Ghuysen, J. M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6449–6458.
- Parès, S., Mouz, N., Petillot, Y., Hakenbeck, R. & Dideberg, O. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 284–289.
- Sauvage, E., Kerff, F., Fonze, E., Herman, R., Schoot, B., Marquette, J.P., Taburet, Y., Prevost, D., Dumas, J., Leonard, G., et al. (2002) *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1223–1232.
- Lim, D. & Strynadka, N. C. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **9**, 870–876.
- Di Guilmi, A. M., Mouz, N., Andrieu, J. P., Hoskins, J., Jaskunas, S. R., Gagnon, J., Dideberg, O. & Vernet, T. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 5652–5659.
- Mouz, N., Gordon, E., Di Guilmi, A. M., Petit, I., Petillot, Y., Dupont, Y., Hakenbeck, R., Vernet, T. & Dideberg, O. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13403–13406.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M. E. G., Vischer, N. O. E. & Nanninga, N. (2003) *Mol. Microbiol.* **47**, 539–547.
- Daniel, R. A., Harry, E. J. & Errington, J. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 299–311.
- Pedersen, L. B., Angert, E. R. & Setlow, P. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 3201–3211.
- Weiss, D. S., Chen, J. C., Ghigo, J. M., Boyd, D. & Beckwith, J. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 508–520.
- Eberhardt, C., Kuerschner, L. & Weiss, D. S. (2003) *J. Bacteriol.* **185**, 3726–3734.
- Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950.
- Esnouf, R. M. (1999) *Acta Crystallogr. D* **55**, 938–940.
- Nicholls, A., Sharp, K. A. & Honig, B. (1991) *Proteins* **11**, 281–296.
- Gouet, P., Robert, X. & Courcelle, E. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3320–3323.

Publication 2

Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes

Pauline Macheboeuf, Carlos Contreras-Martel, Viviana Job, Otto Dideberg & Andréa Dessen

Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CNRS/CEA/UJF), UMR 5075, Laboratoire des Protéines Membranaires, Grenoble, France

Correspondence: Andréa Dessen, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (CNRS/CEA/UJF), Laboratoire des Protéines Membranaires, 41 rue Jules Horowitz, 38027 – Grenoble, France. Tel.: +33 4 38 78 95 90; fax: +33 4 38 78 54 94; e-mail: dessen@ibs.fr

Received 22 December 2005; revised 21 February 2006; accepted 21 February 2006.
First published online 15 June 2006.

DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x

Editor: Jiri Damborsky

Keywords

penicillin binding proteins; resistance; cell cycle.

Abstract

Bacterial cell division and daughter cell formation are complex mechanisms whose details are orchestrated by at least a dozen different proteins. Penicillin-binding proteins (PBPs), membrane-associated macromolecules which play key roles in the cell wall synthesis process, have been exploited for over 70 years as the targets of the highly successful β -lactam antibiotics. The increasing incidence of β -lactam resistant microorganisms, coupled to progress made in genomics, genetics and immunofluorescence microscopy techniques, have encouraged the intensive study of PBPs from a variety of bacterial species. In addition, the recent publication of high-resolution structures of PBPs from pathogenic organisms have shed light on the complex intertwining of drug resistance and cell division processes. In this review, we discuss structural, functional and biological features of such enzymes which, albeit having initially been identified several decades ago, are now being aggressively pursued as highly attractive targets for the development of novel antibiotherapies.

Introduction

The bacterial peptidoglycan, a three-dimensional, net-like mesh which lines the exterior of the cell membrane, not only must be synthesized in a timely manner during the cell cycle but also protects bacteria from osmotic shock. Peptidoglycan determines the overall cellular shape, serves as attachment site for virulence factors and adhesins, aids bacteria in undergoing morphological transformations in response to different stress-related factors, and its eventual fragility or instability may lead to cell lysis and death (Höltje, 1998; Nanninga, 1998). Many Gram-positive bacteria produce a multi-layered peptidoglycan which is incorporated within the inner cell wall surface, moves outward allowing cellular expansion, and is eventually shed into the medium in the form of its building blocks; Gram-negative organisms, on the other hand, carry a thin layer of peptidoglycan, 50% of which is recycled during each cell cycle (Höltje, 1998; Nanninga, 1998).

The peptidoglycan itself is composed of β -linked *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) polysaccharide chains, which are cross-linked through peptide chains on alternating strands (van Heijenoort, 2001). Peptidoglycan synthesis is initiated in the bacterial cytoplasm by six Mur enzymes (named MurA to MurF; Fig. 1), which catalyze the formation of uridine diphosphate (UDP)-MurNAc from a UDP-GlcNAc precursor (MurA and

MurB) and subsequently add five amino acids onto the *D*-lactoyl group of UDP-MurNAc (MurC to MurF). The peptidic sequence may vary according to bacterial species, but is inevitably terminated by a *D*-alanine, *D*-alanine moiety (except in certain vancomycin-resistant enterococcal strains, which carry *D*-alanine, *D*-lactate (Arthur *et al.*, 1998; Lessard & Walsh, 1999), but this is rather an exception). This soluble molecule, UDP-MurNAc-pentapeptide, becomes associated to the bacterial membrane through the action of MraY, a ten transmembrane helix protein, which catalyzes its linkage to a 55-carbon-long phospholipid, harbouring a membrane-embedded undecaprenyl diphosphate group (van Heijenoort, 2001; Bouhss *et al.*, 2004). This molecule, now called Lipid I, is subsequently acted upon by MurG, an *N*-acetylglucosaminyl transferase which adds a soluble UDP-GlcNAc group to it. These reactions thus finalize the synthesis of Lipid II, the disaccharidic precursor for peptidoglycan biosynthesis and substrate for penicillin-binding proteins (PBPs) (Goffin & Ghuyssen, 2002). Cytosolic steps leading to the synthesis of Lipid II are well understood due to the fact that most substrates and enzymes are soluble, and X-ray structures are available for all seven Mur enzymes, albeit from different bacterial species. At this point, however, Lipid II is still within the cytoplasmic compartment, and must be 'flipped' over to the exterior of the membrane (by a yet undetermined 'flippase' activity, which could involve either one or both of the integral

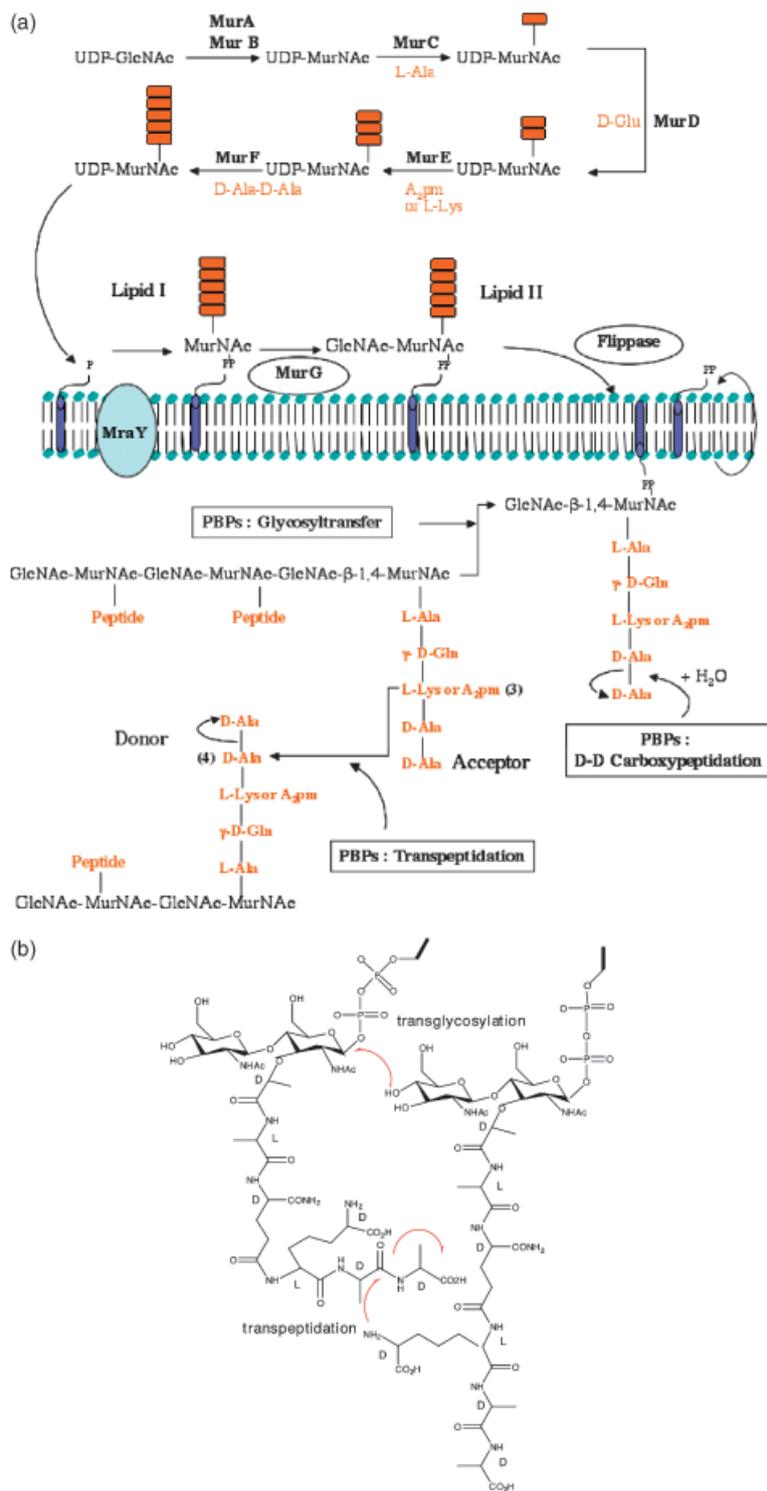


Fig. 1. Peptidoglycan synthesis in a nutshell. Peptidoglycan building blocks are synthesized and assembled in a series of cytoplasmic steps; subsequently they are linked to a membrane-associated undecaprenyl group (generating Lipid I) which is further modified with a GlcNAc group (to form Lipid II) and subsequently 'flipped' to the external side of the membrane. Lipid II located on the external side of the bacterial membrane is the substrate for glycosyltransfer and transpeptidation reactions catalyzed by PBPs. Fig. 1b shows details of these two reactions, which are catalyzed on distinct chains.

membrane proteins FtsW and RodA (Höltje, 1998; Nanninga, 1998). Once on the outer side of the membrane, Lipid II is polymerized and cross-linked by PBPs, membrane-associated enzymes present in all peptidoglycan-containing organisms.

The term 'PBP' has been at times loosely employed in the literature to refer to any enzyme which recognizes and/or metabolizes β -lactams, independently of its function in the cell. The *Streptomyces* K15 and R61 transpeptidases, for example, have often been referred to as PBPs, but, although

they bind to penicillin and are able to catalyze transpeptidation/carboxypeptidation reactions with dipeptides in solution, (Kelly & Kuzin, 1995; Fonzé *et al.*, 1999; Rhazi *et al.*, 2003; Rhazi *et al.*, 2005), they have not been reported to participate in peptidoglycan biosynthesis, and their precise cellular function to date remains unknown. Our goal, in this review, is to highlight the structure and function of the PBP enzymes which are associated to the bacterial membrane and play essential roles in peptidoglycan biosynthesis.

Bacteria have multiple PBPs, some of which have started to reveal their clear roles during the cell division cycle. High molecular mass (HMM) PBPs are classified according to the number of reactions a single polypeptide is able to catalyze: bifunctional (class A) enzymes catalyze both the polymerization of the GlcNAc-MurNAc chains (glycosyltransferase, GT) and cross-linking of adjacent stem peptide (transpeptidation, TP) reactions, while monofunctional (class B) proteins present only transpeptidase activity (Goffin & Ghuysen, 2002). The glycosyltransferase reaction catalyzes the association between MurNAc and GlcNAc groups, employing Lipid II as a substrate (Fig. 1). While the saccharidic chain grows by two sugar units, each reaction generates free undecaprenyl pyrophosphate, which is again 'flipped' back towards the cytosolic side of the membrane where it is hydrolyzed to undecaprenyl phosphate and is recycled in a new reaction (Höltje, 1998; van Heijenoort, 2001). Transpeptidation, on the other hand, generally requires that the enzyme recognize the terminal D-alanine, D-alanine moiety of the stem peptide and catalyze the attack of the carbonyl group of the penultimate D-alanine by the lateral amino group at position (3) of an adjacent chain (in a classical '4-3' crosslink, see Fig. 1). The acceptor involved in enzyme deacylation is the amino group of a glycine residue (as in *Staphylococcus aureus*), that of a lysine residue (as in *Streptococcus pneumoniae*), or of a diaminopimelate group (as in *Escherichia coli*). However, in most bacteria, structural variations are possible, and may range from acetylation and phosphorylation of the sugar units, to addition of extra residues onto the stem pentapeptides. The latter mechanism generates a branched peptidoglycan, a common structural feature in Gram-positive organisms. In streptococci, for example, MurM and MurN catalyze the addition of short dipeptides (serine-alanine or di-alanine) onto the ϵ amino group of the stem peptide lysine; in staphylococci, the same residue is decorated with a pentaglycine group, in reactions catalyzed by the FemX, FemA and FemB enzymes; and in enterococci, the stem peptide lysine harbors either an asparagine or an aspartic acid side chain (van Heijenoort, 2001). Interestingly, these features seem to be linked to an increased level of drug resistance. In streptococci, many penicillin-resistant strains carry branched muropeptides, and inactivation of the *murM* and *murN* genes reverts the drug resistance phenotype and supports synthesis of un-

branched peptidoglycan (Filipe & Tomasz, 2000). Laboratory-selected drug-resistant *Enterococcus faecium* strains bypass D,D-transpeptidation by carrying a L, D transpeptidase which is able to generate cross-links between L-Lys (3) and D-Asn/Asp-L-Lys(3), thus overcoming the 4-3 cross-linking reaction (Mainardi *et al.*, 2002).

In addition, the acceptor in the transpeptidation reaction can also be a water molecule, which will thus finalize a D-alanine, D-alanine (or D, D-) carboxypeptidation reaction, catalyzed by low molecular mass (LMM) PBPs. In this case, stem pentapeptides are hydrolyzed into tetrapeptides (with D-alanine being released), preventing further peptidoglycan crosslinking (Goffin & Ghuysen, 2002). Thus, LMM PBPs are involved in the regulation of the level of peptidoglycan reticulation (Morlot *et al.*, 2004).

Blocking of either the transpeptidation or carboxypeptidation reactions by β -lactam antibiotics, which structurally resemble the D, D- stem peptide moiety, weakens the peptidoglycan and may engender cell death (Ghuysen, 1994). This powerful mechanism, which has made penicillin and its analogs the most widely employed antibiotics for any infectious malady worldwide for the past 70 years, has been challenged by the propagation of drug-resistant strains, underlining the need for novel antibiotic therapies (discussed below). Inhibition of the glycosyltransferase reaction by the natural product moenomycin also weakens the peptidoglycan and kills bacterial cells, but moenomycin's toxicity, a direct consequence of its long half-life, has precluded it from human use (Goldman & Gange, 2000). It is however clear that the glycosyltransferase activity of PBPs is a potential, yet unexplored antibiotherapy target, which awaits solution of its three-dimensional structure as well as elucidation of further biochemical and mechanistic details (Walsh, 2003).

Peptidoglycan synthesis by PBPs: cell division vs. wall elongation

During the bacterial cell cycle, new peptidoglycan must be synthesized at the cell division site (the septum); in rod-shaped cells, such as *E. coli* and *Bacillus subtilis*, peptidoglycan must also be synthesized along the sidewalls (thus ensuring wall elongation), a process also present in *Streptococcus pneumoniae*. Cell division and wall elongation are processes which require timely and precise localization of a variety of essential proteins, including PBPs, on specific sites on the cell wall, and they have been recently described in other reviews (Giesbrecht *et al.*, 1998; Foster & Popham, 2001; Errington *et al.*, 2003; Popham & Young, 2003; Young, 2003; Cabeen & Jacobs-Wagner, 2005; Scheffers & Pinho, 2005). Elegant genetic, immunoprecipitation, biochemical and immunofluorescence experiments performed in *E. coli*, *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Staphylococcus aureus* and

Streptococcus pneumoniae have shown that cell division and elongation processes each employ at least one class A and one class B PBP, themselves possibly complexed to lytic transglycosylases and peptidoglycan-scaffolding proteins (Romeis & Holtje, 1994; Vollmer *et al.*, 1999; Morlot *et al.*, 2003; Popham & Young, 2003; Figge *et al.*, 2004). Cell division is initiated by the polymerization of FtsZ (the bacterial homolog of tubulin) at the septum, underneath the cytoplasmic membrane, into a ring-like structure (Bi & Lutkenhaus, 1991; Errington *et al.*, 2003). In the absence of FtsZ, rod-shaped cells such as *E. coli* are incapable of septation and only elongate, forming long filaments (Bi & Lutkenhaus, 1992); in cocci, such as *Staphylococcus aureus*, FtsZ depletion causes cell wall synthesis to be delocalized over the entire cell surface, rather than localized to the future division site (Pinho & Errington, 2003). Interestingly, FtsZ has been shown to display a GTP hydrolysis-related dynamic behavior, causing the septal ring to remodel itself within a 30-s time frame (Anderson *et al.*, 2004); in addition, it has also recently been shown to localize outside the septal ring, as a member of a potential helical cytoskeleton (Thanedar & Margolin, 2004).

Once FtsZ is positioned at the septum, other members of the septal peptidoglycan formation machinery (described here using *E. coli* nomenclature) start to assemble at the division site in a specific and interdependent fashion: FtsA, ZipA, and ZapA, whose main function may be to provide stability to the FtsZ ring (Den Blaauwen *et al.*, 1999; Gueiros-Filho & Losick, 2002; Pichoff & Lutkenhaus, 2002). Subsequently, FtzK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI (a class B PBP), FtsN and AmiC localize at the same site (Errington *et al.*, 2003); FtsL and FtsB are interdependent for proper localization, and their complex also only localizes in the presence of FtsQ (Buddelmeijer & Beckwith, 2004; Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005). It is of note that, at least in *E. coli*, there is a time lag of approximately 20 min between FtsZ polymerization and septal constriction; it is conceivable that this time difference is necessary to allow cell division proteins to assemble onto the ring itself (Den Blaauwen *et al.*, 1999; Aarsman *et al.*, 2005). In addition, the rate of peptidoglycan synthesis is increased during constriction, a phenomenon which is independent of PBP3 (or FtsI (Wientjes & Nanninga, 1989)). Another class B PBP, PBP2, directs peptidoglycan elongation and insertion of strands into the wall, but is also present at the division site (Spratt, 1975; de Pedro *et al.*, 1997; Den Blaauwen *et al.*, 2003). It is of interest that in *E. coli*, the inhibition of FtsZ in mutants which lack the PBP5 D, D-carboxypeptidase creates morphologically aberrant cells which are twisted into spirals, suggesting that a concerted relationship between FtsZ and low molecular weight PBPs is necessary not only for cell division but also for the determination of cell shape (Varma & Young, 2004).

The participation of class A PBPs in division, although more elusive, has been demonstrated by co-localization with FtsZ during the pneumococcal cell cycle (Morlot *et al.*, 2003). This pathogen contains six PBPs, three of which (PBP1a, PBP2a, PBP1b) are class A (bifunctional) enzymes. Immunofluorescence studies showed that PBP1a co-localized at the septum with FtsZ (although de-localization required a 5-min time lag); PBP1b, on the other hand, localized either septally or equatorially, but never at both places in the same cell, leaving open the question of the function of the latter macromolecule (Morlot *et al.*, 2003). Bacteria which have had specific class A PBP-encoding genes deleted have provided a wealth of information regarding the function of these enzymes in cell division. Mutants of *B. subtilis* PBP1, a septally-located protein (Scheffers & Errington, 2004), display average cell length increase, with additional increases in mutants lacking other bifunctional PBPs (Popham & Setlow, 1995; Popham & Setlow, 1996). In *E. coli*, individual deletion of genes coding for bifunctional enzymes PBP1a and PBP1b is tolerated, but the suppression of both is lethal (Denome *et al.*, 1999); a similar phenomenon was observed in *Streptococcus pneumoniae* cells, which tolerated deletion of either PBP1a, PBP1b, or PBP2a, but double mutations of *pbp1a/pbp1b* or *pbp2a/pbp1b* genes presented abnormal septum positioning. Interestingly, the double *pbp1a/pbp2a* knockout was not viable (Hoskins *et al.*, 1999; Paik *et al.*, 1999), suggesting that pneumococcal viability requires PBP1a and PBP2a for division and elongation, and that PBP1b can substitute for either one of the enzymes, but not for both.

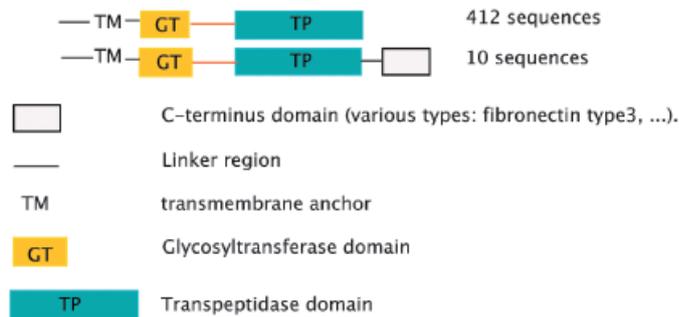
PBPs are multi-domain assemblies

A genomics overview

Our analysis of 213 unique eubacterial genomes (i.e. excluding sequences from drug-resistant variants and those from mycoplasmal species, which do not have peptidoglycan) revealed more than 430 class A and 350 class B PBPs, as well as 250 low molecular mass D, D-carboxypeptidases (Fig. 2). Since PBPs are membrane-associated molecules, most of the HMM enzymes display a short cytoplasmic region at the N-terminus, followed by a single transmembrane region; class A molecules then carry sequences coding for both GT and TP domains, while class B molecules display only a TP domain preceded by an N-terminal unit of unknown function.

Class A PBPs can be found in two main forms (Fig. 2a): the most common arrangement displays GT and TP domains interconnected by a linker of variable length, followed by a short C-terminal sequence. In a second group, the C-terminal region is followed by different structural elements, such as a fibronectin type 3 domain. In general, there are

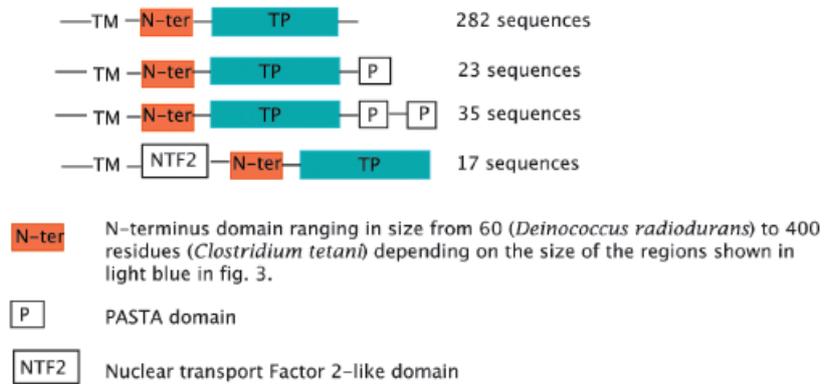
(a) **Class A enzymes**



(b) **Mono Glycosyltransferases**



(c) **Class B enzymes**



(d) **DD-carboxypeptidases**

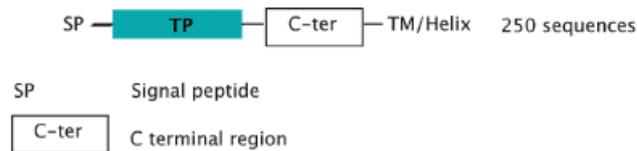


Fig. 2. PBPs are multidomain assemblies. The PBP types represented in this schematic table possess at least 10 members throughout all 213 eubacterial genomes analyzed. All PBPs are associated to the membrane by means of a transmembrane helix (TM) or an amphipathic helix, in the case of LMM PBPs.

two class A PBPs per genome, reflecting the importance of these enzymes in bacterial metabolism. Bacteria may also carry monofunctional GT enzymes (MGTs) which are characterized by a unique GT unit associated to the transmembrane region (Fig. 2b). Although the *in vivo* function of these proteins is yet to be determined with precision, the demonstrated glycosyltransfer activity of the purified molecules (Di Bernardino *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001) suggests that they may play complementary roles to bifunctional enzymes in the bacterial cell cycle.

Class B PBPs can be divided into four main groups (Fig. 2c). The largest and by far most representative one harbors

the simplest arrangement, which involves an N-terminal unit followed by the transpeptidase domain; this group includes well-studied proteins such as PBP3 from *E. coli*. Two other groups are represented by approximately 60 PBPs which display either one or two short sequences corresponding to an α/β unit positioned after the TP domain; streptococcal PBP2x harbors two of these α/β units at its C-terminus (Parès *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 2000). In several databases this α/β unit is identified as a PASTA ('PBP and Ser/Thr kinase attached') domain, since its homologs are harbored by over 100 PBP and kinase sequences (Young *et al.*, 2003). Although the PASTA domain has been

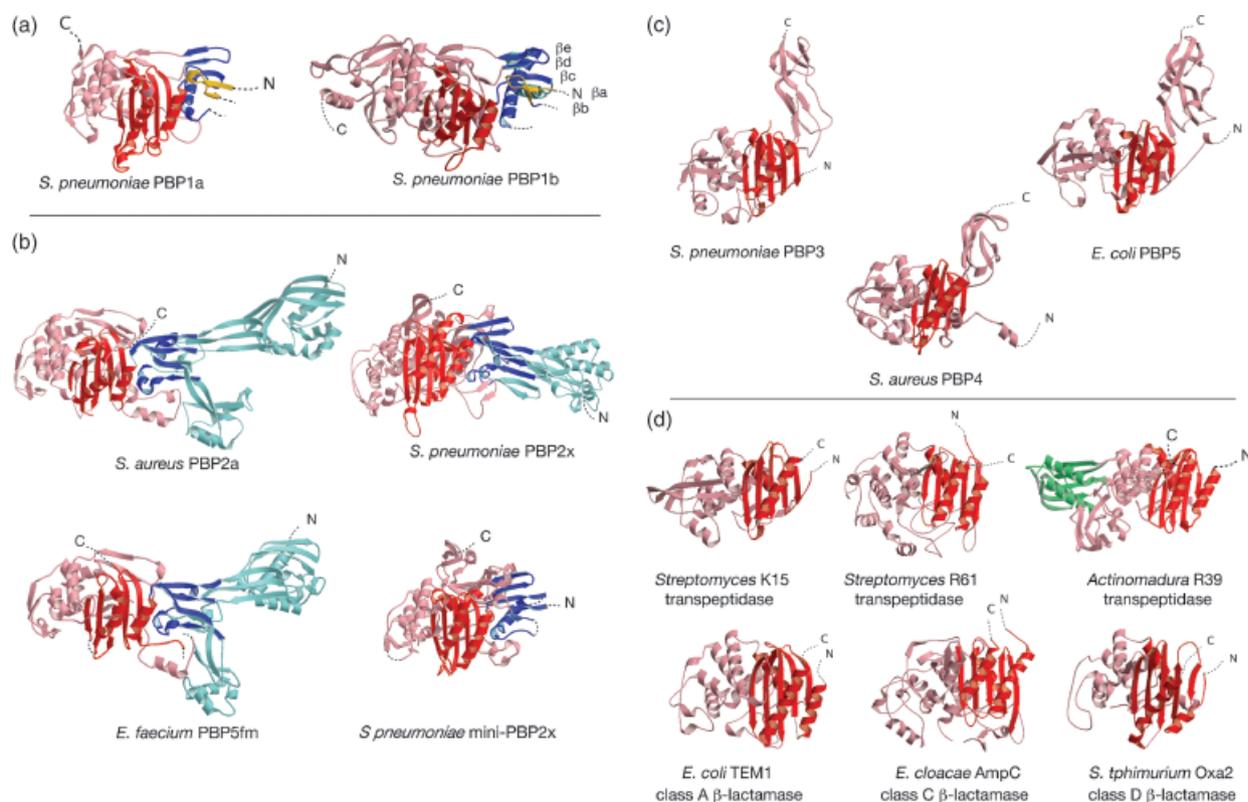


Fig. 3. Peptidoglycan and β -lactam recognizing enzymes share a common, penicillin-recognition domain, composed of a five-stranded β -sheet framed by two or three α -helices and shown in red. (a) HMM Class A PBPs from *Streptococcus pneumoniae*, lacking most of the GT domain. An interdomain linker region (β a– β b and Ha) is shown in dark blue, and includes an N-terminal peptide from the GT domain which remained associated to the molecules after proteolysis of the full-length PBPs, shown in yellow. (b) HMM Class B enzymes from different organisms display a similar N-terminal interdomain linker as the one identified in class A PBPs. (c) In addition to the TP domain, LMM D, D-carboxypeptidases also display an elongated C-terminal ‘pedestal’ preceding the membrane-association region (d) β -lactamases and other transpeptidases that bind β -lactams but do not participate in peptidoglycan biosynthesis also belong to the penicilloyl serine transferase superfamily.

suggested as being a β -lactam binding, peptidoglycan-sensing unit (Yeats *et al.*, 2002), no biochemical evidence regarding this fact is available to date. The last group of class B enzymes harbors an NTF2 (‘nuclear transport factor 2’)-like domain upstream from the N-terminal domain; although the function of this insertion is unclear, this group of enzymes is represented by the well-studied staphylococcal PBP2a and enterococcal PBP5fm (Lim & Strynadka, 2002; Sauvage *et al.*, 2002), whose structures are discussed below. There are approximately 1.7 class B PBPs per eubacterial genome.

LMM PBPs, namely D, D-carboxypeptidases, are unusual in the sense that the TP domain is encoded after a signal peptide and their membrane association is accomplished by either a transmembrane or an amphipathic helix, both C-terminally located (Fig. 2d). D, D- endopeptidases are also present within some genomes, but at 0.07 examples per genome they are far less statistically representative of classical PBPs than the ones shown in Fig. 2.

High molecular mass PBPs – class A and class B enzymes

Class A PBPs are some of the most fascinating, and intractable, macromolecules being explored as potential or *de facto* drug targets today. Several laboratories (academic and industrial alike) have attempted, for many years, to express the glycosyltransferase domain of class A PBPs either in the context of the full-length enzyme or as an independent unit, only to encounter aggregation and instability problems. These results are probably related to the proximity of the glycosyltransferase domain to the membrane, giving it a highly hydrophobic character; in addition, in the absence of the stabilizing bilayer, it is conceivable that it shows signs of instability. Only recently have three reports of successful purifications of soluble forms of class A PBPs (in the absence of detergent) been made available: that of the bifunctional form of PBP1b from *Streptococcus pneumoniae* (which lacks the cytoplasmic region and transmembrane

helix; (Di Guilmi *et al.*, 2003)), and the isolated glycosyl-transferase domains of PBP1b from *E. coli* and PBP2 from *Staphylococcus aureus* (Barrett *et al.*, 2004; Barrett *et al.*, 2005).

To date, structural information for class A PBPs is only available for the protease-resistant cores of PBPs 1a and 1b from *Streptococcus pneumoniae* (Contreras-Martel *et al.*, 2005; Macheboeuf *et al.*, 2005). Difficulties in crystallizing the full-length molecules led the authors to identify a trypsin-resistant region, which, in both enzymes, lacks most of the GT domain but reveals, nevertheless, a very similar three domain organization: the interdomain linker, the transpeptidase domain and a C-terminal region (Fig. 3a, with the interdomain linker shown in dark blue). In both proteins, the interdomain linker represents the region which bridges GT and TP domains in the full-length molecules, and is mostly composed of a small β -sheet (β a– β e), and one helix (Ha). Notably, β a– β e harbors two strands (β a, β b) formed by a short peptide from the GT domain that remained associated to both PBP1a and PBP1b in precisely the same orientation even after proteolysis and protein purification (yellow in Fig. 3a). It is of interest that sequences of the GT peptides in the two different PBPs point to the same region at the N-terminus of the GT unit (Contreras-Martel *et al.*, 2005; Macheboeuf *et al.*, 2005). The almost identical fold of the PBP1a and 1b interdomain linker region suggests that, in the full-length molecules, GT and TP domains may be associated in a very similar fashion. If one considers that class A PBPs must catalyze two concerted reactions during precisely orchestrated cell cycle events, possibly requiring that polymerization of Lipid II glycan chains be initiated prior to transpeptidation (Terrak *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2001; Bertsche *et al.*, 2005), a common positioning for GT and TP active sites in all class A molecules could represent a major advantage within a complex network of partner molecules and substrates, all arranged in a three-dimensional mesh.

The TP domain of class A PBPs is highly reminiscent of the three-dimensional fold of the same domain in class B enzymes, as well as other transpeptidases and serine β -lactamases. It is composed of a central, five-stranded β -sheet (β 1– β 5) surrounded by α -helices, with α 1 and α 11 always in front of the sheet, and α 8 behind; this fold is colored in red in Fig. 3 (PBP structural nomenclature follows that for β -lactamases). The high conservation of this domain within all enzymes which bind β -lactam antibiotics is evident from the analysis of PBPs and other β -lactam recognizing proteins, such as PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* (Parès *et al.*, 1996), PBP2a from *Staphylococcus aureus* (Lim & Strynadka, 2002), PBP5fm from *Enterococcus faecium* (Sauvage *et al.*, 2002), the *Streptomyces* R61 and K15 transpeptidases (Kelly *et al.*, 1985; Fonzé *et al.*, 1999), and β -lactamases (i.e. TEM-1, AmpC and Oxa-2; note the commonality of the red α / β

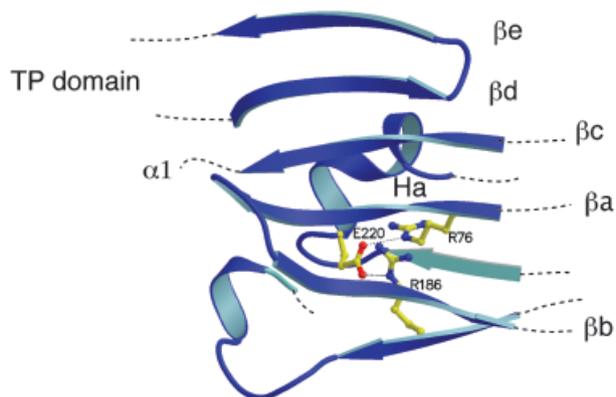


Fig. 4. Close-up of the interdomain linker region of pneumococcal PBP2x, which is characterized by three classical motifs located mostly on β -strands. Three residues (one residue from each motif) converge to form a stabilizing network which could act as an anchor point for domain stabilization.

fold in Fig. 3). Interestingly, although superposition of the TP domains of these enzymes reveals considerable structural deviations (with $C\alpha$ root mean square (r.m.s.) values ranging between 1.4 and 2.9 Å) and little sequence identity (in the range of 15%), the fold itself is common to all, with the positioning of the α -helices around the central sheet showing some angular differences.

The first structure of a class B PBP, that of PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* (Parès *et al.*, 1996), was only obtained after the protein was solubilized by expression in the absence of its cytoplasmic region and transmembrane helix. PBP2x is a three-domain molecule where the central region, which harbors the transpeptidation active site, is flanked by an elongated N-terminal region and a helical-rich C-terminal domain (Fig. 3b). The N-terminal region resembles a sugar tong, but neither it nor the small C-terminal region possess any structural homologs in available databases. The TP domain of PBP2x, however, is reminiscent of that of other PBPs (discussed above).

Structural and sequence comparisons of class B PBPs calls into question the function of the N-terminal domain, which can be highly variable, ranging from 60 amino acids (as in *Deinococcus radiodurans*; UNIPROT Q9RT97) to 400 (*Clostridium tetani*; UNIPROT Q892M5). In Fig. 3b, this domain is shown in light and dark blue. Notably, the class A interdomain linker region identified in the structures of PBP1a and PBP1b (Contreras-Martel *et al.*, 2005; Macheboeuf *et al.*, 2005) has structural counterparts in class B enzymes, located with precisely the same orientation (with respect to the TP domain) as in class A PBPs (note all dark blue regions in Fig. 3a–3b). In class A enzymes, the interdomain linker involves a five-stranded β -sheet (β a– β e) and either two (PBP1b) or one (PBP1a) α -helix; in class B PBPs, only one helix is present (here called Ha), while the

sheet can harbor between four and six β strands. PBP2a and PBP5fm, for example, only have four strands in their interdomain linker (and thus lack β d and β e; Fig. 3b) while PBP2x has a sixth strand located in parallel fashion to β b (Figs 3b and 4). The possibility that this interdomain region plays a common, important role in all class B PBPs stems from the observation that it carries three mostly conserved, albeit degenerate, motifs, previously identified through sequence analyses (Goffin & Ghuysen, 2002). In pneumococcal PBP2x, motifs 1 (RGX₃DRNG) and 3 (GX₂GXEX₃D) are within the central region of the interdomain linker (on β a and Ha, respectively), while motif 2 (RXYPXG) is on a sixth β strand (Fig. 4; only bolded residues are shown as sticks). The three motifs converge in three-dimensional space to form a buried salt bridge/hydrogen-bonding network which can serve as an anchor point which stabilizes the interdomain linker region and the N-terminal domain. A fourth motif also identified by the Ghuysen group (Goffin & Ghuysen, 2002; GXDX₃TXDX₃Q) is present on strand β c but is much less well conserved and does not contribute any residues to the anchor point.

Hence, the size disparity amongst N-terminal domains of class B PBPs seems to be mostly a consequence of the different lengths of regions which are interconnected by β a– β e and Ha (and are shown in light blue in Fig. 3b). In order to highlight this point, a ‘mini-PBP2x’, in which the abovementioned interconnecting loops were shortened to between two and three residues, was cloned, overexpressed and crystallized. Its three-dimensional structure revealed a substantial stabilization of the N-terminal domain, including the formation of a considerably longer helix in the vicinity of the β -strands (compare the dark blue region in PBP2x views in Fig. 3b), revealing that the presence of extensions from the anchor point is dispensable for protein stability (Dideberg *et al.*, 2003).

Interestingly, the N-terminal domain of class B PBPs was originally suggested as serving as a possible association domain for other proteins involved in the bacterial cell cycle (Höltje, 1998), but this function was never demonstrated. It is thus more probable that, in all class B PBPs, the N-terminal domain serves as a pedestal or connector, which points and places the catalytic region of the protein away from the cell membrane and towards the peptidoglycan. It is conceivable that class B PBPs have developed a mechanism by which they can be positioned at a comparable distance from the cellular membrane as their bifunctional counterparts (compare domain organizations in Fig. 2), possibly sharing catalytic responsibilities or contacting other cell cycle-related proteins.

With three-dimensional folds of PBPs from both HMM classes now at hand, it is tempting to propose an evolutionary relationship between such molecules based on specific structural observations. It is of note that within the

structures of the interdomain linker β -sheets present in class B structures, the class A GT peptide is replaced by a peptide from the N-terminal domain. Thus, the interdomain linker may function as a harness, whose role is to provide structural connectivity for whichever domain may be N-terminally located to the TP unit: the GT domain, in class A enzymes, or the pedestal, in class B PBPs. In light of the commonality of the interdomain linker in all high molecular mass PBPs, we propose that class B enzymes evolved either from an ancestral class A molecule or both class A and class B PBPs evolved from a common, bifunctional ancestor whose domains were already connected by the interdomain linker. Solution of other class A and class B structures will shed light on this proposal.

Low molecular mass PBPs

The penicilloyl serine transferase fold is also shared by the LMM PBPs (such as PBP3 from *Streptococcus pneumoniae*, PBP5 from *E. coli* and PBP4 from *Staphylococcus aureus* (Nicholas *et al.*, 2003; Rajashankar *et al.*, 2004; Morlot *et al.*, 2005), which are D, D- carboxypeptidases and, albeit able to recognize the C-terminal end of stem peptides as substrates, do not catalyze a transpeptidation reaction. Interestingly, these molecules possess an elongated, β -strand rich C-terminal domain which separates the catalytic region from the amphipathic helix (the latter not included in the crystal structures; Figs 2 and 3c). This domain has been proposed to act as a pedestal which could position the catalytic region of LMM PBPs in close apposition to the peptidoglycan (Davies *et al.*, 2001; Morlot *et al.*, 2005). If this were the case, the amphipathic helix could permit the enzymes to skid on the membrane surface without being associated within it, while the pedestal could place the catalytic domain at the required height for optimal substrate recognition (Morlot *et al.*, 2005).

Sharing fold, but not function: other transpeptidases and β -lactamases

Soluble transpeptidases such as *Streptomyces* K15 and R61 are some of the most extensively studied enzymes, both from the biochemical and the structural point of view. Although they have not been shown to be involved in bacterial peptidoglycan metabolism, the fact that they are sensitive to β -lactams, have D, D- carboxypeptidase and transpeptidase activities, and their crystals in apo and complexed forms diffract X-rays to high resolution has allowed the study of transpeptidation and β -lactam active site recognition in atomic detail. Like PBPs and β -lactamases, these proteins also carry the penicilloyl serine transferase fold characterized by a five-stranded β -sheet and two or three angled helices (Fig. 3d); the active site lies between the conserved α/β region and the C-terminal domains (Kelly

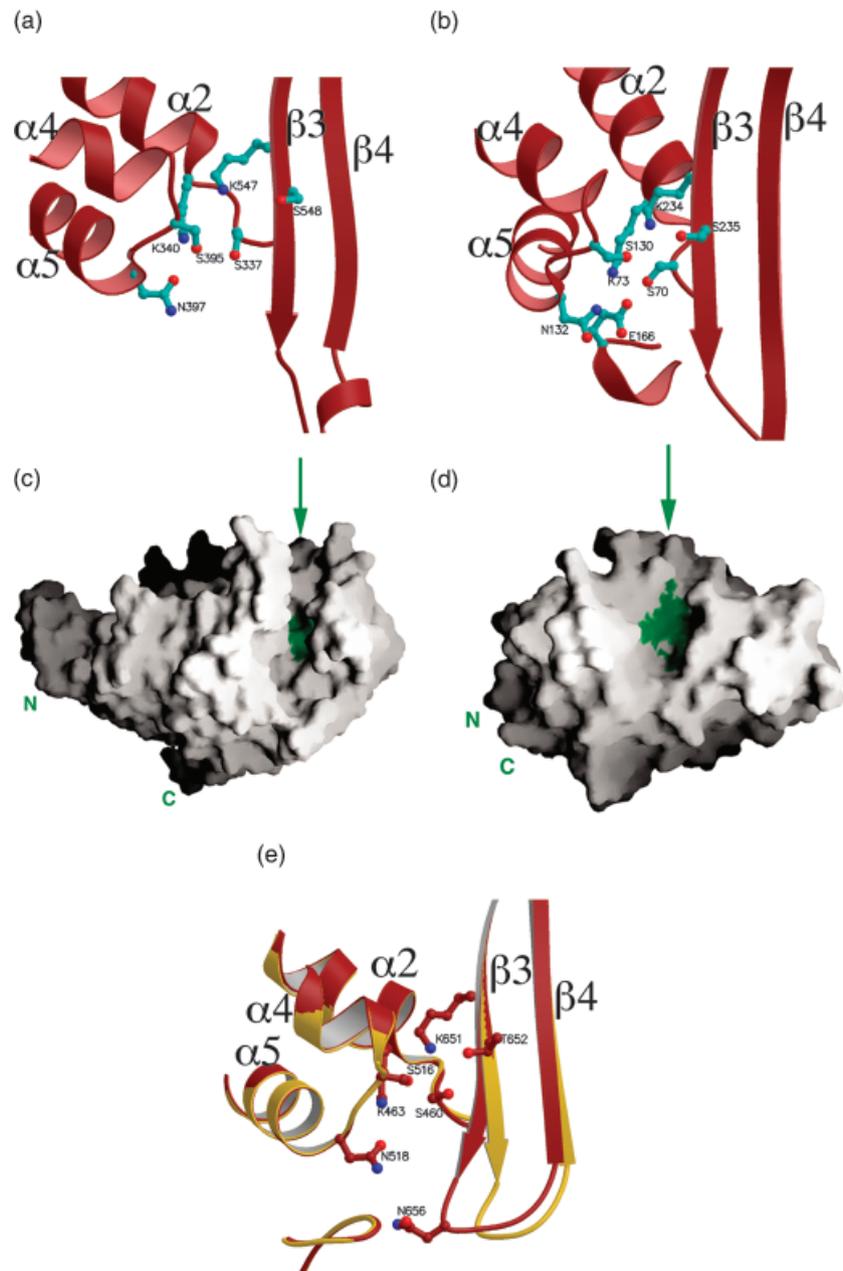


Fig. 5. The active sites of PBPs and β -lactamases. (a) The active site of pneumococcal PBP2x and (b) TEM-1 β -lactamase share a very similar three-dimensional arrangement, with the catalytic serine (SXXK) in hydrogen-bonding distance to residues from the SXN and KT(S)G motifs. (c) The surface representation of PBP2x shows that the active site (in green) is nestled within an elongated cleft, while that of TEM-1 β -lactamase (d) is a pocket on the surface of the molecule. (e) The superposition of open (yellow) and closed (brown) forms of PBP1b from *Streptococcus pneumoniae* reveals that active site closure separates the C-terminus of β 3 and the N-terminus of β 4, and only when the cleft is open (by ligand binding) do the two β -strands recover their antiparallel nature.

et al., 1985; Fonzé *et al.*, 1999). Interestingly, the R39 *Actinomadura* transpeptidase, as well as PBP4 from *E. coli*, in addition to the aforementioned domains, harbor an additional unit which has been described as corresponding to one half of a Rossmann fold (green in Fig. 3d). Although its function seems to be unclear, a highly charged surface has been identified as a possible protein interaction platform (Sauvage *et al.*, 2005; Kishida *et al.*, 2006).

β -lactamases are secreted enzymes which hydrolyze the lactam bond of β -lactam antibiotics with great efficiency, and have been identified in a variety of bacterial species. β -lactamases are divided into class A to D based on primary

structures; three-dimensional structures of representative enzymes of all four classes are now available, providing a plethora of data on catalysis and mechanisms of drug resistance (Dideberg *et al.*, 1987; Herzberg & Moulton, 1987; Lobkovsky *et al.*, 1993; Carfi *et al.*, 1995; Paetzel *et al.*, 2000; Garau *et al.*, 2005). Active site serine- β -lactamases, direct structural descendants of PBPs (Parès *et al.*, 1996), also belong to the superfamily of penicillin-recognizing enzymes and thus harbor the conserved α/β fold described above (Fig. 3d). Complex epidemiologic analyses of β -lactamase-producing pathogens performed by laboratories worldwide, coupled to extensive chemical synthesis efforts and detailed studies on

enzyme action and inhibition have been the driving forces in the development of multi-generational β -lactams which have, in part, aided in circumventing, or at least delaying, an expansive drug-resistance problem (discussed below).

Mechanism, active sites and β -lactam action

PBPs are serine acyltransferases whose TP-associated catalytic activity, in addition to catalyzing the formation of cross-linked peptidoglycan, is also the target of β -lactam antibiotics. Upon binding to the PBP catalytic cleft, β -lactams become covalently associated to the active site serine; the resulting acyl-enzyme can only be hydrolyzed at a very slow rate, thus reducing the amount of peptidoglycan cross-linking. β -lactamases, however, are able to hydrolyze the β -lactam ring with extremely high turnover rates (Goffin & Ghuysen, 2002). In both cases, these activities require three fingerprint sequence motifs: Ser-X-X-Lys, where Ser is the catalytic nucleophile and is located at the N-terminus of $\alpha 2$; Ser(Tyr)-X-Asn(Cys), which lies on the loop between $\alpha 4$ and $\alpha 5$, and Lys(His)-Thr(Ser)-Gly, which lines $\beta 3$ (where X is any amino acid; Figs 5a and 5b). Interestingly, in PBPs, the active site is located at the bottom of an elongated cleft, while in β -lactamases it is positioned within a surface pocket (Figs 5c and 5d) (Gordon *et al.*, 2000; Contreras-Martel *et al.*, 2005). This localization, rather intuitive, clearly reflects the fact that, *in vivo*, PBPs must accommodate two stem peptides within their cleft, while β -lactamases only have to recognize β -lactam antibiotics.

It is of note that the active site of pneumococcal PBP1b, a class A enzyme, was recently shown to vary between open (active) and closed (inactive) states (Macheboeuf *et al.*, 2005). In the absence of ligand, the interactions between the C-terminus of $\beta 3$ and the N-terminal region of $\beta 4$ are disrupted by the movement of the intervening loop into the active site region, which blocks entry into the active site cleft and forms an interaction with the left side of the cavity. The strength of this interaction is such that the C-terminus of $\beta 3$ is separated from $\beta 4$, affecting the anti-parallel nature of the two strands. This closed active site configuration, which had not been observed for any other peptidoglycan or β -lactam-recognizing enzyme, is modified into an open form in the presence of the antibiotics nitrocefin or cefotaxime (notice the conformational modification required for ligand recognition in Fig. 5e). Interestingly, the open form of the enzyme was only obtained after authors soaked PBP1b crystals (containing the 'closed' form of the enzyme) in S2d, a thio-analog of the stem peptide, subsequently washing away the molecule and re-soaking the crystals in antibiotic solutions. The observation of this unusual active site restructuring mechanism led to the suggestion that within a dormant cell or during phases of the cell cycle, when their activity is not

necessary, PBPs may be inactive, and thus have their active sites closed. As their catalytic activity becomes necessary, such as during peptidoglycan elongation and cell division phases, they are activated, bringing about active site opening either by contact with other proteins involved in cell division or the presence of the substrate itself (Macheboeuf *et al.*, 2005). It is of interest that the latter possibility is supported by *in vivo* observations made on PBPs from different organisms. In *Staphylococcus aureus*, PBP2, a class A enzyme, requires its substrate in order to localize to the septum and participate in division; in experiments where either the active site was blocked or the peptidoglycan was modified, PBP2 no longer localized to the division site, being present around the entire cell surface (Pinho & Errington, 2005). *Escherichia coli* PBP3 (this a class B enzyme) becomes acylated at a faster rate in dividing cells than in non-dividing cells, and it is conceivable that the enzyme's transpeptidase activity may become activated during septation (Eberhardt *et al.*, 2003). Thus, *in vivo* and structural observations all point to the possibility that PBPs may exist in both closed and open conformations in the cell, the former switching into the latter depending on substrate availability or localization (Macheboeuf *et al.*, 2005).

Escherichia coli PBP1b has been the enzyme of choice for the study of transpeptidation and glycosyltransfer reactions catalyzed by PBPs. In a recent article, Vollmer and colleagues (Bertsche *et al.*, 2005) have shown that the full-length *E. coli* PBP1b (thus containing the transmembrane segment) is a dimer, and catalyzes both reactions on the Lipid II substrate simultaneously; subsequently, a secondary transpeptidation activity could also be identified, confirming the previously reported delayed transpeptidation event for this enzyme (Terrak *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2001). Although these studies prove that the TP domain of PBPs is capable of transpeptidation, crystal structures of PBPs complexed to substrates, products or catalysis intermediates are still not available. Hence, detailed information regarding the TP-catalyzed mechanism can only be inferred from studies performed with antibiotics, pentapeptide pseudosubstrates or peptidic boronic acid inhibitors (Jamin *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 2000; Lim & Strynadka, 2002; Pechenov *et al.*, 2003; Contreras-Martel *et al.*, 2005; Macheboeuf *et al.*, 2005; Nicola *et al.*, 2005), as well as from high-resolution complexes and kinetic studies performed on the R61 transpeptidase (Anderson & Pratt, 2000; McDonough *et al.*, 2002; Rhazi *et al.*, 2005) and β -lactamases (Strynadka *et al.*, 1992; Pratt, 2002; Chen *et al.*, 2004). Based on results from these authors and numerous others who have painstakingly delved into details of PBP catalysis, a general route for PBP-catalyzed transpeptidation has been widely discussed in the literature. In brief, after the stem pentapeptide has been accommodated in the elongated active site cleft, a non-covalent complex is formed involving the penultimate

D-alanine group and the nucleophilic serine. In PBPs and R61 D, D-transpeptidase, the methyl group of the penultimate D-alanine of the substrate is buried in a hydrophobic pocket at the bottom of the cleft, explaining why the requirement for a D-alanine at the penultimate position is more stringent than at the C-terminus of the stem peptide. Interestingly, the absence of a pocket at the same position in β -lactamases guarantees that they do not recognize peptidoglycan (Pratt, 2002).

Binding is followed by the nucleophilic attack of a deprotonated active site serine on the penultimate D-alanine moiety, which gives rise to a stable acyl-enzyme intermediate. The withdrawal of a proton from the active site serine has been proposed to be accomplished by either the lysine residue of the Ser-X-X-Lys motif (located on $\alpha 2$) or the carboxylate group of the substrate (Damblon *et al.*, 1996; Ishiguro & Imajo, 1996; Gordon *et al.*, 2000; Lim & Strynadka, 2002; Nicola *et al.*, 2005). Subsequently, the nucleophilicity of the active site serine hydroxyl group must be increased so that deacylation can proceed; for PBPs, details of this step are still a matter of controversy.

In class A β -lactamases, Glu166, located on the omega loop and hence at the bottom of the active site cleft (Fig. 5b), abstracts a proton from the catalytic serine via a water molecule. The absence of such a residue in PBPs precludes this mechanism, and may explain the drastic difference in deacylation rate constants between these enzymes (9 s^{-1} and 10^{-5} s^{-1} ; (Gordon *et al.*, 2000; Goffin & Ghuyssen, 2002)); because the half-life on a PBP- β -lactam complex is in the range of 10 h, and the bacterial doubling time is approximately 30 min, it becomes clear how a long-lived blocked PBP active site can be disadvantageous for the cell. Both the catalytic lysine and the serine residue of the SXN motif have been suggested as possible general bases in the deacylation reaction (Nicola *et al.*, 2005). It is of interest that, in the high resolution crystal structures of the CTX-M class A β -lactamases complexed to different transition state analogs, the catalytic lysine group changes conformation as the reaction proceeds, suggesting that it may act both by activating the catalytic serine for nucleophilic attack and stabilizing the negative charge which is created in the deacylation transition state (Chen *et al.*, 2004).

PBPs and drug resistance

Once a PBP is acylated by a β -lactam antibiotic, it is unable to catalyze hydrolysis of the covalent acyl-enzyme intermediate and is inactivated; peptidoglycan transpeptidation cannot occur, and the cell wall is weakened. Although this fact has been the stronghold of the action of β -lactam antibiotics for decades, the emergence of drug-resistant strains has proven to be a worldwide problem. Gram-negative pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and

E. coli evade β -lactam action by excreting β -lactamases into the periplasm. In another mechanism, the antibiotic cannot access its macromolecular target due to its forced efflux from the bacterium via an antibiotic efflux pump, such as the MexA,B-OprM pump in *Pseudomonas* strains (Nehme & Poole, 2005). In addition, certain Gram-positive bacteria, such as streptococci, which do not secrete β -lactamases, produce highly mutated, drug-insensitive PBPs. *Staphylococcus aureus* strains circumvent β -lactam action by acquiring a novel, highly drug resistant class B PBP (PBP2a) through horizontal transfer of the *mecA* gene from a yet unidentified species (Wu *et al.*, 2001; Pinho *et al.*, 2001). Enterococci, some of which are major nosocomial pathogens, are naturally resistant to β -lactams due to the presence of one PBP (PBP5fm in *E. faecium*) with low level affinity for penicillin and its analogs; point mutations in or overproduction of PBP5fm can lead to very high levels of resistance (Zorzi *et al.*, 1996; Sauvage *et al.*, 2002). Interestingly, albeit the incorporation of these key PBP mutations, resistant bacteria still seem to divide and turn over peptidoglycan at comparable rates; the complex mechanisms underlining this enduring catalytic efficiency are unknown.

Pneumococcal PBP2x and PBP1a

Streptococcus pneumoniae is naturally highly transformable microorganism which, through interspecies homologous recombination, is able to acquire blocks of genes from drug-resistant species and thus develop mosaic PBPs which may have up to 100 mutations (Spratt, 1994). In the pneumococcus, a low-level β -lactam resistance is accomplished by mutations in PBP2x and PBP2b; high-level resistance, however, requires additional mutations in a class A enzyme, PBP1a (Reichmann *et al.*, 1996; Hakenbeck *et al.*, 1998; Hakenbeck & Coyette, 1998). Although the structure of PBP1a from a drug-resistant strain is not yet available, the crystal structure of the wild type enzyme upon which all of the mutations found in PBP1a from a highly drug resistant clinical isolate were mapped reveals a 'mutational hotspot' in the form of a semi-circle around the catalytic cleft. An analysis of sequences of PBP1a molecules from resistant pneumococcal isolates from different countries reveals a very similar pattern of mutations, suggesting that acquisition of the hotspot in the active site area could be a universal mechanism of PBP1a-related drug resistance (Contreras-Martel *et al.*, 2005).

Structural and biochemical studies of both clinical and laboratory PBP2x mutants have revealed at least two mechanisms of pneumococcal resistance to β -lactam-type drugs. The first one was evidenced by the analysis of PBP2x from highly penicillin resistant clinical isolate Sp328 [minimal inhibitory concentration (MIC) for

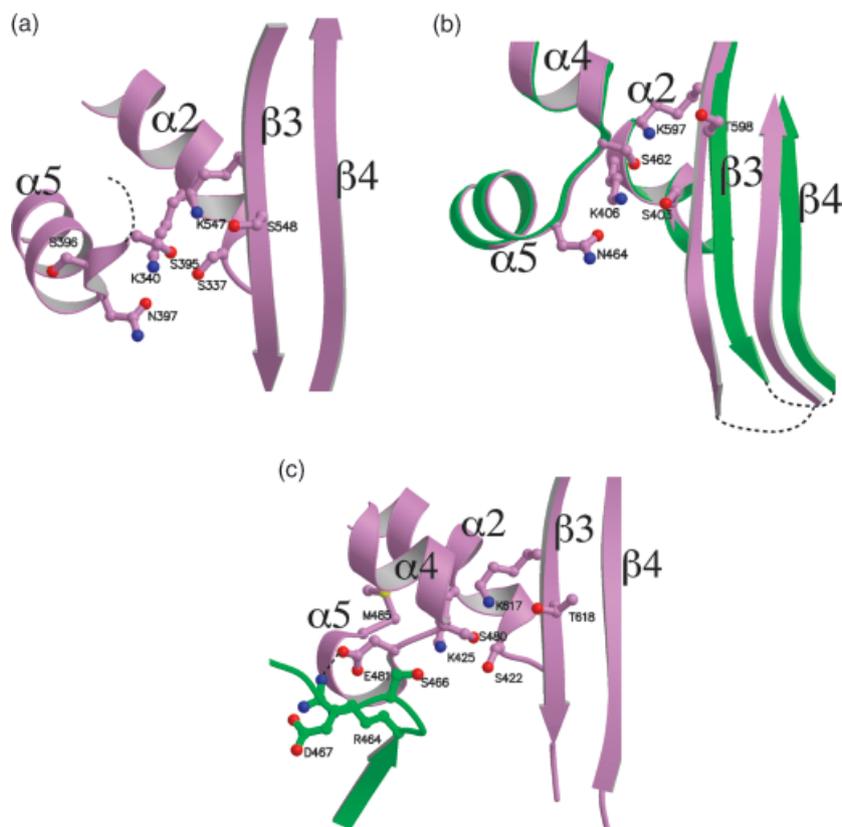


Fig. 6. Antibiotic resistance through effects on PBPs arises as a consequence of different mechanisms. (a) the crystal structure of pneumococcal PBP2x from drug resistant strain Sp328 displays no density neither for $\alpha 4$ nor for the loop between $\alpha 4$ and $\alpha 5$ (dotted lines), revealing a 'flexible' left side of the active site cavity (compare with Fig. 5a). (b) The active site of PBP2a from *Staphylococcus aureus* in uncomplexed (purple) and complexed (green) forms reveals that drug resistance may be related to active site distortion and domain movement. (c) The active site of PBP5fm from *Enterococcus faecium* suggests that insertion of a residue between amino acids 466 and 467 (green), which stabilize the left side of the cavity, could dramatically affect active site configuration.

penicillin = $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; MIC for a drug-sensitive strain is of approximately $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Chalkley *et al.*, 1991)]. This molecule, which contains 92 mutations when compared to PBP2x from the sensitive strain, possesses an active site where the Ser-X-Asn motif, which is located on the loop between $\alpha 4$ and $\alpha 5$, is displaced away from the active site (Fig. 6a) (Dessen *et al.*, 2001). Recent elegant mutagenesis and kinetic studies performed on PBP2x from another highly drug-resistant pneumococcal strain (5204) showed this loop to be indeed highly susceptible to protease digestion (and thus flexible/unstructured), thus defining the loop between $\alpha 4$ and $\alpha 5$ in PBP2x to be an important resistance determinant (Carapito *et al.*, 2005). In addition, a mutation of the residue that immediately follows the catalytic Ser from Thr to Ala affects the local hydrogen bonding pattern, and together with the mutations described above, plays a key role in lowering the acylation efficiency for β -lactams (Mouz *et al.*, 1998; Mouz *et al.*, 1999; Dessen *et al.*, 2001). It is of note that a mutation in the Thr residue which follows the active site serine is also present in PBP1a from most drug-resistant pneumococcal strains; in this case, the Thr residue is burrowed in a hydrophobic pocket, and its mutation could affect non-polar interactions occurring within the region (Contreras-Martel *et al.*, 2005).

The second resistance mechanism which involves pneumococcal PBP2x was evidenced by the study of mutant molecules from low drug resistance strain 5259 (MIC penicillin = $0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$). In this case, although the active site is in a closed conformation, there is a charge modification at the entry of the catalytic gorge as a result of a mutation from Gln552 to Glu and the entire $\beta 3$ strand shows a slight closure movement when compared to the molecule from the sensitive strain. Since antibiotics are negatively charged, the inclusion of an acidic residue at the entry of the catalytic groove could hinder drug accessibility to the site, thus participating in the resistance mechanism (Pernot *et al.*, 2004).

Interestingly, the crystal structure of a laboratory PBP2x mutant which contains the two key mutations Thr338Ala/Met339Phe in the immediate vicinity of the active site residue Ser337 reveals a major distortion of $\alpha 2$, which is probably responsible for the marked decrease in acylation efficiencies with a variety of β -lactams (Chesnel *et al.*, 2003). Thus, through the introduction of mutations which can affect active site stability and charge in an essential enzyme, the pneumococcus is capable of avoiding β -lactam recognition and/or stabilization within the cleft, while still being able to process peptidoglycan.

Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus is a major cause of hospital-acquired, multi-drug resistant infections. Its methicillin-resistant variant (MRSA) appeared in 1961, one year after the introduction of methicillin into the market, and now is prevalent in hospital settings worldwide (Chambers, 2001). *Staphylococcus aureus* employs a distinct method for the development of resistance to β -lactams than the pneumococcus; instead of acquiring blocks of mutations that will affect PBP structure and function, it produces an exogenous, class B PBP (PBP2' or PBP2a). PBP2a is encoded by the *mecA* gene, and it is acquired through the horizontal transfer of a genetic element (SCCmec) from a yet unidentified donor (Wu *et al.*, 2001; Pinho *et al.*, 2001b; Enright *et al.*, 2002). Since the other four PBPs in *Staphylococcus aureus* are β -lactam sensitive, PBP2a can take over their functions even after their inactivation, thus conferring broad resistance by displaying low affinity to a variety of β -lactams, albeit continuing to catalyze the transpeptidation reaction (Pinho *et al.*, 2001), as is the case for pneumococcal PBP2x (Mouz *et al.*, 1998, 1999).

PBP2a synthesis is inducible through a signal transduction system encoded by the genes on the SCCmec genetic element, and involves an integral membrane protein sensor (MecR1) and a transcriptional repressor (MecI). De-repression of *mecA* transcription by MecI is accomplished through a signaling cascade involving the sensing of β -lactams in the extracellular environment by MecR1 and the transmission of a signal, which involves its conformational change, proteolysis of its cytoplasmically-located domain, and interaction with MecI (Garcia-Castellanos *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001). The expressed PBP2a is a 78 kDa enzyme which acts as a transpeptidase only when other PBPs have been inactivated (Pinho *et al.*, 2001). The crystal structure of PBP2a, both in apo form as well as complexed to β -lactams, reveals that drug resistance is achieved through a distorted active site, necessitating movement of β_3 for drug binding (Fig. 6b). This unusual conformation would be required only upon the catalytic transition from the enzyme-drug Michaelis complex to the covalent intermediate, a costly energetic step highly likely to be responsible for the enzyme's recalcitrance to blockage by such drugs (Lim & Strynadka, 2002). A close look at both liganded and unliganded structures reveals that antibiotic binding could require rotation of the entire TP domain (or 'opening' between the TP and C-terminal domains). It is of interest that staphylococcal strains displaying very high levels of drug resistance and with mutations within PBP2a have also already been identified (Katayama *et al.*, 2004).

Drug resistance in *Enterococcus faecium*: PBP5fm

Enterococci are generally 10 to 1000-fold less susceptible to β -lactams than streptococci (Murray, 1990). Such natural

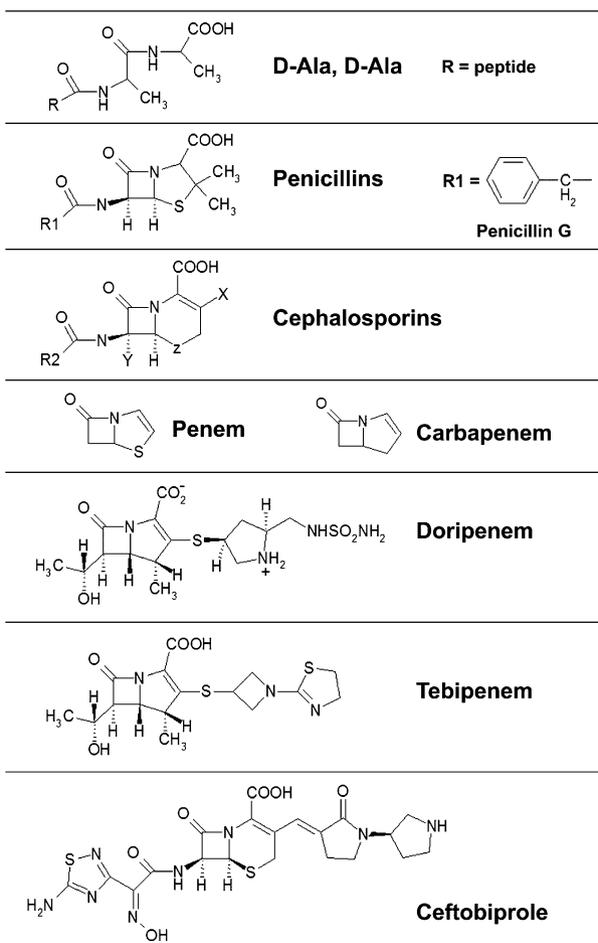


Fig. 7. Chemical structures of molecules which interact with the TP domain of PBPs. The effectiveness of β -lactam antibiotics as PBP inhibitors stems from the structural similarity these antibiotics share with the D-Ala, D-Ala portion of the stem peptide, as seen in the first two examples. In cephalosporins and penicillins, R1, R2, X, and Z reflect different moieties which are associated to the central structure in order to generate distinct antibiotics or second- and third-generation molecules.

resistance is linked to production of a class B PBP with low affinity for β -lactams, PBP5fm, which takes over the catalytic role of other PBPs when these are inhibited by antibiotics. In fact, overproduction of PBP5fm is linked to an initial, low level of resistance (Rybkin *et al.*, 1998). However, acquisition of mutations within the PBP5fm sequence are responsible for the development of even higher levels of resistance which may reach MIC values of $512 \mu\text{g mL}^{-1}$ (al-Obeid *et al.*, 1990; Murray, 1990; Fontana *et al.*, 1994; Zorzi *et al.*, 1996). The crystal structure of PBP5fm reveals that it contains a classical transpeptidase domain preceded by an elongated N-terminal region (Sauvage *et al.*, 2002). Within its active site (Fig. 6c), Met485 is located three residues after the Ser480-X-Asn482 catalytic triad, and its mutation into Thr

or Ala is responsible for MIC values which are 16-fold higher than for wild type. It is conceivable that the absence of the large Met side chain allows the catalytic Lys425, located nearby, to have more degrees of freedom, thus participating less efficiently in the acylation mechanism (Rybkin *et al.*, 1998; Sauvage *et al.*, 2002). It is also of note that, in certain resistant enterococcal strains, a single serine residue (Ser466') is introduced in the PBP5fm sequence (thus in between residues 466 and 467 (Zorzi *et al.*, 1996)). Indeed, the left side of the cavity of PBP5fm is already stabilized by a salt bridge between Arg464 and Asp481, and Val465 plays a key role in β -lactam recognition; insertion of a residue at position 466' could affect this recognition pattern, and thus β -lactam binding (Rybkin *et al.*, 1998; Sauvage *et al.*, 2002).

PBPs as targets for novel antibacterial development

The bacterial cell wall biosynthetic machinery remains one of the most promising niches for antibiotic targets. Many proteins which participate in its metabolism are essential for bacterial viability, and a similar macromolecular framework is absent in humans, two important conditions for the development of antibiotherapy. Although PBPs have been known and studied for over 40 years, it is only now that a plethora of genetic, biochemical, immunofluorescence and structural data are coming together to reveal the full potentiality of PBPs for the development of novel antibiotics.

Since the introduction of penicillin into the market, several other β -lactams (naturally occurring or synthesized) have been made available (Fig. 7). Carbapenems are penicillin analogs which, instead of the classical β -lactam ring, carry an unsaturated five-membered ring which lacks the sulfur atom; they are broad-spectrum molecules which display strong bactericidal action against enterobacteria, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* and even *Mycobacterium tuberculosis*, the latter of which is recalcitrant to treatment with most β -lactam antibiotics (Chambers *et al.*, 2005; Coulthurst *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005). Carbapenems are not hydrolyzed by class A or C β -lactamases, but can be targeted by class B metallo- β -lactamases; although the production of this type of β -lactamase by pathogens in clinical settings is rare, some outbreaks have already been recorded (Peleg *et al.*, 2005). Doripenem, a parenteral carbapenem, is in clinical trials in both Japan and the United States for the treatment of respiratory and urinary tract infections, respectively, and has shown high efficacy even against pathogenic strains which are resistant to other β -lactams (Bush *et al.*, 2004; Fritsche *et al.*, 2005). In addition, tebipenem, an oral carbapenem, has also shown efficacy against drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains; it

targets PBP1a and PBP2b, high molecular mass enzymes, as well as PBP3, a D, D- carboxypeptidase. Tebipenem is currently in Phase II clinical trials in Japan (Kobayashi *et al.*, 2005).

Ceftobiprole, a broad-spectrum cephalosporin which is active against methicillin-resistant and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as well as penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* bacteria, derives its efficacy from its ability to bind to PBP2a, which is naturally recalcitrant to binding of other β -lactams (see above; (Hebeisen *et al.*, 2001; Chambers, 2005)). Ceftobiprole was developed by Basilea Pharmaceutica AG and is currently being tested in Phase III clinical trials for complicated skin infections and pneumonia (see <http://www.basilea.com>).

In addition to targeting the PBP TP active site with novel β -lactams, two additional strategies are currently being tackled, largely by academic and small biotech groups. The first one includes searching for transpeptidation inhibitors whose chemical structures do not resemble those of β -lactams and thus will be unlikely to display cross-resistance. In this respect, two novel classes of arylalkylidene-related molecules seem to affect cell wall synthesis in a variety of different pathogens by inhibiting key PBPs, including PBP2x in *Streptococcus pneumoniae* and PBP2a in *Staphylococcus aureus* (Zervosen *et al.*, 2004), and could be interesting starting points for the development of new non- β -lactams. A second strategy includes the search for inhibitors of the GT activity of PBPs which, in many cases, is essential for cell survival. GT domains share little or no sequence similarity with other glycosyltransferases and have yet to be studied from a structural point of view; it is conceivable, thus, that they may display a novel fold which could represent a very interesting potential antibiotic development target.

Concluding remarks

The central involvement of PBPs in bacterial cell cycle processes has been recognized for over 30 years, and the key roles that they play in antibiotic resistance mechanisms in a variety of pathogens has also been documented by laboratories worldwide. However, it is only in the past few years that groups employing techniques ranging from immunofluorescence localization to structure solution, chemical synthesis and membrane biochemistry, have started to converge upon a detailed functional and structural study of PBPs. Certainly, the near future should answer questions relating to their specific and timely functions in the cell, their macromolecular partners, and most importantly, how the scientific community can continue to exploit their well-studied active sites for the development of novel antibiotherapies which can presently circumvent widespread drug resistance problems.

Acknowledgements

The authors wish to thank E. Sauvage and P. Charlier for the coordinates of PBP5fm from *E. faecium*, as well as A.M. DiGuilmi, A. Zapun and T. Vernet (IBS) for helpful discussions. Figures were prepared with GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) and Molscript (<http://www.avatar.se/molscript/>) programs. Work in the Laboratoire des Proteines Membranaires is supported by the European Commission 6th Framework program in the form of grants LSMH-CT- 2003-5033335 (COBRA) and LSHM-CT-2004-512138 (EUR-INTAFAR).

References

- Aarsman ME, Piette A, Fraipont C, Vinkenvleugel TM, Nguyen-Disteche M & Den Blaauwen T (2005) Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol* **55**: 1631–1645.
- al-Obeid S, Gutmann L & Williamson R (1990) Modification of penicillin-binding proteins of penicillin-resistant mutants of different species of enterococci. *J Antimicrob Chemother* **26**: 613–618.
- Anderson DE, Gueiros-Filho FJ & Erickson HP (2004) Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J Bacteriol* **186**: 5775–5781.
- Anderson JW & Pratt RF (2000) Dipeptide binding to the extended active site of the *Streptomyces* R61 D-alanyl-D-alanine peptidase: the path to a specific substrate. *Biochemistry* **39**: 12200–12209.
- Arthur M, Depardieu F, Cabanie L, Reynolds P & Courvalin P (1998) Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol Microbiol* **30**: 819–830.
- Barrett DS, Chen L, Litterman NK & Walker S (2004) Expression and characterization of the isolated glycosyltransferase module of *Escherichia coli* PBP1b. *Biochemistry* **43**: 12375–12381.
- Barrett D, Leimkuhler C, Chen L, Walker D, Kahne D & Walker S (2005) Kinetic characterization of the glycosyltransferase module of *Staphylococcus aureus* PBP2. *J Bacteriol* **187**: 2215–2217.
- Bertsche U, Breukink E, Kast T & Vollmer W (2005) In vitro murein (peptidoglycan) synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1b from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 38096–38101.
- Bi EF & Lutkenhaus J (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **354**: 161–164.
- Bi EF & Lutkenhaus J (1992) Isolation and characterization of ftsZ alleles that affect septal morphology. *J Bacteriol* **174**: 5414–5423.
- Bouhss A, Crouvoisier M, Blanot D & Mengin-Lecreulx D (2004) Purification and characterization of the bacterial MraY translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *J Biol Chem* **279**: 29974–29980.
- Buddelmeijer N & Beckwith J (2004) A complex of *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol Microbiol* **52**: 1315–1327.
- Bush K, Macielag M & Weidner-Wells M (2004) Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond Phase 1. *Curr Opin Microbiol* **7**: 466–476.
- Cabeen MT & Jacobs-Wagner C (2005) Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* **3**: 601–610.
- Carapito R, Chesnel L, Vernet T & Zapun A (2005) Pneumococcal β -lactam resistance due to a conformational change in penicillin-binding protein 2x. *J Biol Chem* **281**: 1771–1777.
- Carfi A, Parès S, Duée E, Galleni M, Duez C, Frère JM & Dideberg O (1995) The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase reveals a new type of protein fold. *EMBO J* **14**: 4914–4921.
- Chalkley L, Schuster C, Potgieter E & Hakenbeck R (1991) Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and *Viridans* streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **69**: 35–42.
- Chambers HF (2001) The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* **7**: 178–182.
- Chambers HF (2005) Evaluation of ceftobiprole in a rabbit model of aortic valve endocarditis due to methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 884–888.
- Chambers HF, Turner J, Schechter GF, Kawamura M & Hopewell PC (2005) Imipenem for treatment of tuberculosis in mice and humans. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 2816–2821.
- Chen Y, Shoichet B & Bonnet R (2004) Structure, function, and inhibition along the reaction coordinate of CTX-M β -lactamases. *J Am Chem Soc* **127**: 5423–5434.
- Chesnel L, Pernot L, Lemaire D, Champelovier D, Croize J, Dideberg O, Vernet T & Zapun A (2003) The structural modifications induced by the M339F substitution in PBP2x from *Streptococcus pneumoniae* further decreases the susceptibility to beta-lactams of resistant strains. *J Biol Chem* **278**: 44448–44456.
- Contreras-Martel C, Job V, Di Guilmi AM, Vernet T, Dideberg O & Dessen A (2005) Crystal structure of Penicillin-Binding Protein 1a (PBP1a) reveals a mutational hotspot implicated in β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **355**: 684–696.
- Coulthurst SJ, Barnard AML & Salmond GPC (2005) Regulation and biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. *Nature Rev Microbiol* **3**: 295–306.
- Damblon C, Raquet X, Lian LY, Lamotte-Brasseur J, Fonze E, Charlier P, Roberts GC & Frère JM (1996) The catalytic mechanism of beta-lactamases: NMR titration of an active site lysine residue of the TEM-1 enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1747–1752.
- Davies C, White SW & Nicholas RA (2001) Crystal structure of a deacylation-defective mutant of penicillin-binding protein 5 at 2.3-Å resolution. *J Biol Chem* **276**: 616–623.

- de Pedro MA, Quintela JC, Holtje JV & Schwarz H (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 2823–2834.
- Den Blaauwen T, Aarsman ME, Vischer NO & Nanninga N (2003) Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Mol Microbiol* **47**: 539–547.
- Den Blaauwen T, Buddelmeijer N, Aarsman ME, Hameete CM & Nanninga N (1999) Timing of FtsZ assembly in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5167–5175.
- Denome SA, Elf PK, Henderson TA, Nelson DE & Young KD (1999) *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* **181**: 3981–3993.
- Dessen A, Mouz N, Gordon E, Hopkins J & Dideberg O (2001) Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate. *J Biol Chem* **276**: 45106–45112.
- Di Berardino M, Dijkstra A, Stuber D, Keck W & Gubler M (1996) The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesizing enzymes. *FEBS Lett* **392**: 184–188.
- Di Guilmi AM, Dessen A, Dideberg O & Vernet T (2003) Functional characterization of penicillin-binding protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **185**: 1650–1658.
- Dideberg O, Charlier P, Wery JP, Dehottay P, Dusart J, Ercicum T, Frère JM & Ghuysen JM (1987) The crystal structure of the beta-lactamase of *Streptomyces albus* G at 0.3 nm resolution. *Biochem J* **245**: 911–913.
- Dideberg O, Vernet T & Mouz N (2003) Mini-proteine PBP2x de *Streptococcus pneumoniae* et utilisations correspondantes. Patent number EP1521771. France.
- Eberhardt C, Kuerschner L & Weiss DS (2003) Probing the catalytic activity of a cell division-specific transpeptidase *in vivo* with beta-lactams. *J Bacteriol* **185**: 3726–3734.
- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H & Spratt BG (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7687–7692.
- Errington J, Daniel RA & Scheffers DJ (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 52–65.
- Figge RM, Divakaruni AV & Gober JW (2004) MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, coordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **51**: 1321–1332.
- Filipe SR & Tomasz A (2000) Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4891–4896.
- Fontana R, Aldegheri M, Ligozzi M, Lopez H, Sucari A & Satta G (1994) Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1980–1983.
- Fonzé E, Vermeire M, Nguyen-Disteche M, Brasseur R & Charlier P (1999) The crystal structure of a penicilloyl-serine transferase of intermediate penicillin sensitivity. The DD-transpeptidase of *Streptomyces* K15. *J Biol Chem* **274**: 21853–21860.
- Foster SJ & Popham DL (2001) Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules. *Bacillus Subtilis and its Closest Relatives: from Genes to Cells* (Sonenshein L, Hoch JA, eds), American Society for Microbiology, pp. 21–41. Washington, DC.
- Fritsche TR, Stilwell MG & Jones RN (2005) Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report. *Clin Microbiol Infect* **11**: 974–984.
- Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frère JM & Dideberg O (2005) A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol* **345**: 785–795.
- Garcia-Castellanos R, Mallorqui-Fernandez G, Marrero A, Potempa J, Coll M & Gomis-Ruth FX (2004) On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with its operator. *J Biol Chem* **279**: 17888–17896.
- Ghuysen JM (1994) Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Trends Microbiol* **2**: 372–380.
- Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H & Wecke J (1998) Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microb Mol Biol Rev* **62**: 1371–1414.
- Goffin C & Ghuysen JM (2002) Biochemistry and comparative genomics of SXXK superfamily acyltransferases offer a clue to the mycobacterial paradox. *Microb Mol Biol Rev* **66**: 702–738.
- Goldman RC & Gange D (2000) Inhibition of transglycosylation involved in bacterial peptidoglycan synthesis. *Curr Med Chem* **7**: 801–820.
- Gordon E, Mouz N, Duée E & Dideberg O (2000) The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J Mol Biol* **299**: 501–509.
- Gueiros-Filho FJ & Losick R (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* **16**: 2544–2556.
- Hakenbeck R & Coyette J (1998) Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* **54**: 332–340.
- Hakenbeck R, König A, Kern I, van der Linden M, Keck W, Billot-Klein D, Legrand R, Schoot B & Gutmann L (1998) Acquisition of five high-Mr penicillin-binding protein variants during transfer of high-level beta-lactam resistance from *Streptococcus mitis* to *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **180**: 1831–1840.
- Hebeisen P, Heinze-Krauss I, Angehrn P, Hohl P, Page MG & Then RL (2001) *In vitro* and *in vivo* properties of Ro 63-9141, a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 825–836.
- Herzberg O & Moulton J (1987) Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5 Å resolution. *Science* **236**: 694–701.

- Höltje JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 181–203.
- Hoskins J, Matsushima P, Mullen DL, Tang J, Zhao G, Meier TI, Nicas TI & Jaskunas SR (1999) Gene disruption studies of Penicillin-Binding Proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 6552–6555.
- Ishiguro M & Imajo S (1996) Modeling study on a hydrolytic mechanism of class A beta-lactamases. *J Med Chem* **39**: 2207–2218.
- Jamin M, Hakenbeck R & Frère JM (1993) Penicillin-binding protein 2x as a major contributor to intrinsic β -lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett* **331**: 101–104.
- Katayama Y, Zhang HZ & Chambers H (2004) PBP2a mutations producing very high level resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 453–459.
- Kelly JA, Knox JR, Moews PC, Hite GJ, Bartolone JB, Zhao H, Joris B, Frère JM & Ghuysen JM (1985) 2.8 Å structure of penicillin-sensitive D-alanyl carboxypeptidase-transpeptidase from *Streptomyces* R61 and complexes with beta-lactams. *J Biol Chem* **260**: 6449–6458.
- Kelly JA & Kuzin AP (1995) The refined crystallographic structure of a D-peptidase penicillin-target enzyme at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* **254**: 223–236.
- Kishida H, Unzai S, Roper DI, Lloyd A, Park S-Y & Tame JRH (2006) Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics. *Biochemistry* **45**: 783–792.
- Kobayashi R, Konomi M, Hasegawa K, Morozumi M, Sunakawa K & Ubukata K (2005) In vitro activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic against penicillin nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 889–894.
- Lessard IA & Walsh CT (1999) Mutational analysis of active site residues of the enterococcal D-ala-D-ala dipeptidase Van X and comparison with *Escherichia coli* D-ala-D-ala ligase and D-ala-D-ala carboxypeptidase VanY. *Chem Biol* **6**: 177–187.
- Lim D & Strynadka NC (2002) Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* **9**: 870–876.
- Lobkovsky E, Moews PC, Liu H, Zhao H, Frere JM & Knox JR (1993) Evolution of an enzyme activity: crystallographic structure at 2 Å resolution of cephalosporinase from the ampC gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11257–11261.
- Macheboeuf P, Di Guilmi AM, Job V, Vernet T, Dideberg O & Dessen A (2005) Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 577–582.
- Mainardi JL, Morel V, Fourgeaud M, Cremniter J, Blanot D, Legrand R, Frehel C, Arthur M, Van Heijenoort J & Gutmann L (2002) Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem* **277**: 35801–35807.
- McDonough M, Anderson J, Silvaggi N, Pratt R, Knox J & Kelly J (2002) Structures of two kinetic intermediates reveal species specificity of penicillin-binding proteins. *J Mol Biol* **322**: 111–122.
- Morlot C, Noirclerc-Savoye M, Zapun A, Dideberg O & Vernet T (2004) The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **51**: 1641–1648.
- Morlot C, Pernet L, Le Gouellec A, Di Guilmi AM, Vernet T, Dideberg O & Dessen A (2005) Crystal structure of a peptidoglycan synthesis regulatory factor (PBP3) from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **280**: 15984–15991.
- Morlot C, Zapun A, Dideberg O & Vernet T (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**: 845–855.
- Mouz N, Gordon E, Di Guilmi A, Petit I, Pétilloy Y, Dupont Y, Hakenbeck R, Vernet T & Dideberg O (1998) Identification of a structural determinant for resistance to beta-lactam antibiotics in gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13403–13406.
- Mouz N, Di Guilmi AM, Gordon E, Hakenbeck R, Dideberg O & Vernet T (1999) Mutations in the active site of penicillin-binding protein PBP2x from *Streptococcus pneumoniae*. Role in the specificity for beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem* **274**: 19175–19180.
- Murray BE (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* **3**: 46–65.
- Nanninga N (1998) Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 110–125.
- Nehme D & Poole K (2005) Interaction of the MexA and MexB components of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4375–4378.
- Nicholas RA, Krings S, Tomberg J, Nicola G & Davis C (2003) Crystal structure of wild-type penicillin-binding protein 5 from *Escherichia coli*: implications for deacylation of the Acyl-enzyme complex. *J Biol Chem* **278**: 52826–52833.
- Nicholls A, Sharp KA & Honig B (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**: 281–296.
- Nicola G, Peddi S, Stefanova M, Nicholas RA, Gutheil WG & Davies C (2005) Crystal structure of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5 bound to a tripeptide boronic acid inhibitor: a role for Ser-110 in deacylation. *Biochemistry* **44**: 8207–8217.
- Noirclerc-Savoye M, Le Gouellec A, Morlot C, Dideberg O, Vernet T & Zapun A (2005) In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **55**: 413–424.
- Paetzel M, Danel F, de Castro L, Mosimann SC, Page MG & Strynadka NC (2000) Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol* **7**: 918–925.
- Paik J, Kern I, Lurz R & Hakenbeck R (1999) Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* **181**: 3852–3856.

- Parès S, Mouz N, Pétillot Y, Hakenbeck R & Dideberg O (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat Struct Biol* **3**: 284–289.
- Pechenov A, Stefanova ME, Nicholas RA, Peddi S & Gutheil WG (2003) Potential transition state analogue inhibitors for the penicillin-binding proteins. *Biochemistry* **42**: 579–588.
- Peleg AY, Franklin C, Bell JM & Spelman DW (2005) Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* **41**: 1549–1556.
- Pernot L, Chesnel L, Le Gouellec A, Croizé J, Vernet T, Dideberg O & Dessen A (2004) A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to β -lactam antibiotics. *J Biol Chem* **279**: 16463–16470.
- Pichoff S & Lutkenhaus J (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J* **21**: 685–693.
- Pinho MG, de Lencastre H & Tomasz A (2001) An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10886–10891.
- Pinho MG & Errington J (2003) Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol Microbiol* **50**: 871–881.
- Pinho MG & Errington J (2005) Recruitment of penicillin-binding protein PBP2 to the division site of *Staphylococcus aureus* is dependent on its transpeptidation substrates. *Mol Microbiol* **55**: 799–807.
- Popham DL & Setlow P (1995) Cloning, nucleotide sequence, and mutagenesis of the *Bacillus subtilis* *ponA* operon, which codes for penicillin-binding protein (PBP) 1 and a PBP-related factor. *J Bacteriol* **177**: 326–335.
- Popham DL & Setlow P (1996) Phenotypes of *Bacillus subtilis* mutants lacking multiple class A high-molecular-weight penicillin-binding proteins. *J Bacteriol* **178**: 2079–2085.
- Popham DL & Young KD (2003) Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Curr Opin Microbiol* **6**: 594–599.
- Pratt RF (2002) Functional evolution of the serine β -lactamase active site. *J Chem Soc* **2**: 851–861.
- Rajashankar KR, Ray SS, Bonanno JB, Pinho M, Tomasz A & Burley SK (2004) Crystal structure of penicillin-binding protein 4 (PBP4) from *Staphylococcus aureus*. PDB code 1TVE, in press.
- Reichmann P, König A, Marton A & Hakenbeck R (1996) Penicillin-binding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **2**: 177–181.
- Rhazi N, Charlier P, Dehareng D, Engher d, Vermeire M, Frère JM, Nguyen-Disteche M & Fonze E (2003) Catalytic mechanism of the *Streptomyces* K15 DD-transpeptidase/penicillin-binding protein probed by mutagenesis and structural analysis. *Biochemistry* **42**: 2895–2906.
- Rhazi N, Delmarcelle M, Sauvage E, Jacquemotte F, Devriendt K, Tallon V, Ghosez L & Frère JM (2005) Specificity and reversibility of the transpeptidation reaction catalyzed by the *Streptomyces* R61 D-ala-D-ala peptidase. *Protein Sci* **14**: 2922–2928.
- Romeis T & Holtje JV (1994) Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 21603–21607.
- Rybkin T, Mainardi JL, Sougakoff W, Collatz E & Gutmann L (1998) Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of beta-lactam resistance. *J Infect Dis* **178**: 159–163.
- Sauvage E, Herman R, Petrella S, Duez C, Bouillenne F, Frère JM & Charlier P (2005) Crystal structure of the *Actinomyces* R39 DD-peptidase reveals new domains in penicillin-binding proteins. *J Biol Chem* **280**.
- Sauvage E, Kerff F, Fonze E, et al. (2002) The 2.4-Å crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5fm from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1223–1232.
- Scheffers DJ & Errington J (2004) PBP1 is a component of the *Bacillus subtilis* cell division machinery. *J Bacteriol* **186**: 5153–5156.
- Scheffers DJ & Pinho MG (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 585–607.
- Schwartz B, Markwalder JA & Wang Y (2001) Lipid II: total synthesis of the bacterial cell wall precursor and utilization as a substrate for glycosyltransfer and transpeptidation by Penicillin Binding Protein (PBP) 1b of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* **123**: 11638–11643.
- Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM & Archer GL (1998) Interaction of native and mutant MecI repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. *J Bacteriol* **180**: 2160–2166.
- Spratt BG (1975) Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 2999–3003.
- Spratt BG (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* **264**: 388–393.
- Strynadka NC, Adachi H, Jensen SE, Johns K, Sielecki A, Betzel C, Sutoh K & James MN (1992) Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* **359**: 700–705.
- Terrak M, Ghosh TK, Van Heijenoort J, Van Beeumen J, Lampilas M, Aszodi J, Ayala JA, Ghuysen JM & Nguyen-Disteche M (1999) The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 350–364.
- Thanedar S & Margolin W (2004) FtsZ exhibits rapid movement and oscillation waves in helix-like patterns in *Escherichia coli*. *Curr Biol* **14**: 1167–1173.

- van Heijenoort J (2001) Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* **18**: 503–519.
- Varma A & Young KD (2004) FtsZ collaborates with penicillin binding proteins to generate bacterial cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 6768–6774.
- Vollmer W, von Rechenberg M & Höltje JV (1999) Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 6726–6734.
- Walsh C (2003) Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol* **1**: 65–70.
- Wang QM, Peery RB, Johnson RB, Alborn WE, Yeh WK & Skatrud PL (2001) Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**: 4779–4785.
- Wientjes FB & Nanninga N (1989) Rate and topography of peptidoglycan synthesis during cell division in *Escherichia coli*: concept of a leading edge. *J Bacteriol* **171**: 3412–3419.
- Wu SW, de Lencastre H & Tomasz A (2001) Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**: 2417–2424.
- Yeats C, Finn RD & Bateman A (2002) The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27**: 438.
- Young KD (2003) Bacterial shape. *Mol Microbiol* **49**: 571–580.
- Young TA, Delagoutte B, Endrizzi JA, Falick AM & Alber T (2003) Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat Struct Biol* **10**: 168–174.
- Zervosen A, Lu WP, Chen Z, White RE, Demuth TP Jr. & Frère J-M (2004) Interactions between penicillin-binding proteins (PBPs) and two novel classes of PBP inhibitors, arylalkylidene rhodanines and arylalkylidene iminothiazolidin-4-ones. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 961–969.
- Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM & Chambers HF (2001) A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science* **291**: 1962–1965.
- Zorzi W, Zhou XY, Dardenne O, Lamotte J, Raze D, Pierre J, Gutmann L & Coyette J (1996) Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* **178**: 4948–4957.

Streptococcus pneumoniae, pathogène majeur de la sphère oro-pharyngée, résiste fréquemment aux antibiotiques de la famille des β -lactamines généralement administrés dans les infections associées à ce pathogène. Les cibles de ces antibiotiques sont des enzymes responsables de la biosynthèse du peptidoglycane bactérien, les Penicillin-Binding Proteins (PBP) dont la structure du site actif est modifiée dans le cas de souches résistantes aux antibiotiques. Dans un premier temps, la résolution de la structure à haute résolution par cristallographie des rayons X de PBP1b, une des trois PBP bifonctionnelles du pneumocoque, a mis en évidence un phénomène de réorganisation structurale du site actif de la molécule en fonction de son interaction avec un pseudo-substrat de la réaction. Ce résultat nous a permis de proposer que l'ouverture du site actif joue un rôle clef lors du processus de division cellulaire. Dans un deuxième temps, nous avons résolu les structures de complexes entre PBP1b et de nouvelles molécules inhibitrices, ce qui permet d'ouvrir la voie de la mise au point rationnelle de nouveaux médicaments. Pour finir, nous avons caractérisé le domaine glycosyltransférase de PBP1b, qui représente une nouvelle cible moléculaire pour le développement de nouveaux antibactériens, notamment par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS). Cette approche originale nous a permis de proposer un modèle d'organisation et de pliage de ce domaine au sein de ces protéines.

Streptococcus pneumoniae, a major pathogen of the upper respiratory tract, is often found to be resistant to β -lactam antibiotics, drugs which are commonly used in pneumococcal associated infections. The targets of these antibiotics are enzymes involved in bacterial peptidoglycan biosynthesis, the Penicillin-Binding Proteins (PBPs), whose active site structure is modified in resistant strains. In this work we present first the high resolution crystal structure of PBP1b, one of the three bifunctional pneumococcal PBPs, which revealed a structural reorganization of the active site as a consequence of its interaction with a pseudo-substrate of the reaction. This result led us to suggest that the active site opening plays a key role during the cell division process. Then, we solved the structures of complexes between PBP1b and various inhibitors, which can facilitate the process of rational drug-design. Finally, we characterized the glycosyltransferase domain of PBP1b, representing a new molecular target for drug development, by small angle X-ray scattering (SAXS). This original approach allowed us to provide a model concerning the organization and folding of this domain of this vital class of enzymes.